

Caracterización del papel regulador de CbrB en *Pseudomonas putida*

**Memoria presentada por Cristina Isabel Amador Hierro para optar al grado de Doctora, Noviembre
de 2011**

La Directora de la Tesis,

El Codirector de la tesis,

La Doctoranda

Dra. Inés Canosa Pérez-Fragero

Dr. Eduardo Santero Santurino

Cristina Isabel Amador Hierro

1. INTRODUCCIÓN	11
1.1. El género <i>Pseudomonas</i>	12
1.1.1. <i>Pseudomonas putida</i> como modelo de bacteria ambiental	13
1.1.2. La regulación de la expresión génica en <i>Pseudomonas</i>	14
1.1.3. Regulación de promotores dependientes de σ^N mediada por sistemas de dos componentes.	16
1.1.3.1. Sistemas reguladores de dos componentes	16
1.1.3.2. Activación de promotores de tipo σ^N	18
1.1.3.3. Los reguladores de respuesta de promotores σ^N pertenecientes a sistemas de dos componentes	21
1.2. Metabolismo del carbono en <i>P. putida</i>	24
1.2.1. La regulación global del carbono por la proteína Crc.....	26
1.3. El sistema de dos componentes CbrAB	26
2. OBJETIVOS.....	30
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
3.1. Estirpes, plásmidos, oligonucleótidos y condiciones de cultivo usados en esta tesis.....	33
3.1.1. Estirpes utilizadas en esta tesis	33
3.1.2. Plásmidos utilizados en esta tesis.....	35
3.1.3. Oligonucleótidos utilizados en esta tesis.....	36
3.1.4. Medios y condiciones de cultivo generales.	39
3.1.5. Condiciones de cultivo específicos	40
3.1.5.1. Cultivo de biofilms en cámaras de flujo continuo de nutrientes	40
3.1.5.2. Crecimiento de biofilms en placas multipocillo	44
3.1.5.3. Crecimiento de películas en la interfase líquido-gas.....	44
3.1.5.4. Cultivos para determinar la resistencia a metales pesados	45
3.1.5.5. Crecimiento en un medio de cultivo con limitación de hierro	46
3.1.5.6. Ensayo de movilidad en agar blando.....	46
3.1.5.7. Medida de la capacidad de agregación de un cultivo de <i>P. putida</i>	46
3.2. Manipulación de ácidos nucleicos.	47
3.2.1. Preparación de DNA plasmídico.	47
3.2.2. Preparación de DNA cromosómico.	47
3.2.3. Amplificación de DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	47
3.2.4. Electroforesis de DNA.....	48
3.2.5. Aislamiento y purificación de fragmentos de DNA.....	49
3.2.6. Clonación de fragmentos de DNA en plásmidos.	49

3.2.7. Transferencia de plásmidos por conjugación.....	49
3.2.8. Obtención de células competentes.....	50
3.2.9. Transferencia de plásmidos por electroporación.....	50
3.2.10. Transferencia de plásmidos por transformación mediante choque térmico.....	51
3.2.11. Secuenciación de DNA.....	51
3.2.12. Preparación de RNA total.....	51
3.2.13. Hibridación de sondas de DNA (Southern blotting)	52
3.2.14. Construcción del doble mutante <i>cbrB ntrC</i> , MPO400	54
3.2.15. Construcción del mutante de delección <i>cbrB</i> , MPO401	54
3.3. Manipulación de proteínas.....	55
3.3.1. Electroforesis desnaturizante de proteínas en geles de poliacrilamida-SDS.....	55
3.3.2. Detección de proteínas en PAGE por reconocimiento antígeno-anticuerpo (Western blot).....	55
3.4. Análisis de la expresión génica.....	56
3.4.1. Ensayos de actividad β -galactosidasa.....	56
3.4.2. Retrotranscripción de RNA.....	57
3.4.3. Microarray genómico de <i>Pseudomonas putida</i> KT2440.....	58
3.4.4. Análisis de la expresión global mediante microarrays de DNA.....	58
3.4.5. PCR cuantitativa (RT-qPCR).....	60
3.4.6. Determinación del inicio de transcripción mediante extensión desde el cebador (<i>Primer extension</i>).....	62
3.5. Técnicas de microscopía y análisis de imágenes.....	63
4. RESULTADOS	65
4.1. Capítulo 1: Análisis de la regulación del metabolismo del carbono o carbono y nitrógeno por CbrB en <i>Pseudomonas putida</i>	66
4.1.1. Análisis de la capacidad de utilización de distintos aminoácidos como fuente de carbono, nitrógeno y carbono/nitrógeno por las estirpes KT2442 y los mutantes <i>cbrB</i> , <i>ntrC</i> y <i>cbrBntrC</i>	66
4.1.1.1. Utilización de histidina	67
4.1.1.2. Utilización de arginina.....	68
4.1.1.3. Utilización de Ornitina	69
4.1.1.4. Utilización de Tirosina	70
4.1.1.5. Utilización de Prolina	70
4.1.1.6. Utilización de Glutamato	71
4.1.2. Caracterización fenotípica de la utilización de otras fuentes de carbono por <i>Pseudomonas putida</i>	72

4.1.2.1.	Crecimiento en citrato y en succinato como fuente de carbono	72
4.1.2.2.	Análisis fenotípico de <i>Pseudomonas putida</i> mediante <i>Phenotype microarrays</i>	73
4.1.3.	Búsqueda de condiciones de inducción global para el sistema Cbr	75
4.1.3.1.	Crecimiento en medio completo LB o LB diluido.....	76
4.1.3.2.	Crecimiento en medio mínimo con casaminoácidos	77
4.1.3.3.	Crecimiento en L-aminoácidos.....	78
4.2.	Capítulo 2: Análisis de la regulación ejercida por el regulador transcripcional CbrB en <i>Pseudomonas putida</i>.....	79
4.2.1.	Estudio del patrón global de expresión mediado pr CbrB: análisis transcriptómico mediante <i>microarrays</i> de DNA	79
4.2.1.1.	Análisis comparativo del patrón de expresión de la estirpe silvestre KT2442 y el mutante <i>cbrB</i> (MPO406).	80
4.2.1.2.	Análisis comparativo del patrón de expresión de la estirpe mutante <i>ntrC</i> (MPO201) y el doble mutante <i>cbrBntrC</i> (MPO400).	81
4.2.1.3.	Integración de ambas aproximaciones y agrupación según los patrones de expresión.....	82
4.2.2.	Validación de los resultados de los <i>microarrays</i> mediante RT-PCR cuantitativa	85
4.2.3.	Caracterización de la regulación de los elementos del sistema de dos componentes	86
4.2.3.1.	Determinación de las condiciones de inducción de <i>cbrB</i>	86
4.2.3.2.	Determinación del inicio de la transcripción de <i>cbrA</i> y <i>cbrB</i>	87
4.3.	Capítulo 3. Caracterización fenotípica del mutante <i>cbrB</i> (MPO406).	89
4.3.1.	Ensayos de movilidad y quimiotaxis	90
4.3.1.1.	Ensayos de <i>swimming</i> en agar blando	90
4.3.1.2.	Ensayos de <i>swarming</i> en agar blando.....	91
4.3.1.3.	Caracterización del flagelo	92
4.3.2.	Resistencia a estrés por metales pesados	93
4.3.2.1.	Ensayo de dilución en gota en presencia de metales pesados.....	94
4.3.2.2.	Ensayo de supervivencia: conteo de número de viables en presencia de zinc y cobre	94
4.3.3.	Almacenamiento/disponibilidad de hierro.....	96
4.3.4.	Adhesión celular y vida multicelular	97
4.3.4.1.	Determinación de la capacidad de adhesión de un cultivo a una superficie sólida: Ensayos de formación de biofilm en microplaca	97
4.3.4.2.	Capacidad de agregación	99
4.4.	Capítulo 4. Caracterización de la formación de biofilms del mutante <i>cbrB</i> (MPO406).	100
4.4.1.	Identificación de la formación de biofilms en la interfase líquido-gas.....	100

4.4.2.	Caracterización de la formación de biofilms en cámaras de flujo	105
4.4.2.1.	Caracterización de la dinámica de adhesión celular y maduración del biofilm en condiciones estándar	105
4.4.2.2.	Caracterización de la dinámica de adhesión celular y maduración del biofilm en presencia de SDS.....	107
4.4.2.3.	Caracterización de la dinámica de dispersión del biofilm por limitación de nutrientes y/o oxígeno	108
4.4.2.4.	Caracterización de la dinámica de dispersión del biofilm en presencia de agentes químicos o antibióticos.....	108
4.4.3.	Ensayos de competencia en cultivo mixto del mutante <i>cbrB</i> (MPO406) frente a la estirpe silvestre	112
4.4.3.1.	Determinación de la capacidad de colonización del sustrato por las estirpes silvestre y mutante <i>cbrB</i> (MPO406).....	112
4.4.3.2.	Determinación de la capacidad de colonización del sustrato de la estirpe <i>cbrB</i> (MPO406) en proporción celular inferior con respecto a la silvestre.....	113
4.5.	Capítulo 5: Construcción de un mutante de delección de <i>cbrB</i> ($\Delta cbrB$, MPO401) nulo y comparación con el mutante de inserción (<i>cbrB::miniTn5luxABKm</i>, MPO406).....	116
4.5.1.	Caracterización y descripción del mutante de inserción MPO406.....	116
4.5.2.	Construcción de un mutante de delección de <i>cbrB</i> ($\Delta cbrB$, MPO401) de <i>P. putida</i> KT2442	117
4.5.3.	Caracterización y comparación fenotípica de los mutantes MPO401 ($\Delta cbrB$) y MPO406 (<i>cbrB::miniTn5luxABKm</i>)	117
4.5.3.1.	Adhesión celular.....	118
4.5.3.2.	Crecimiento en distintas fuentes de carbono y complementación funcional	118
4.5.3.3.	Resistencia a estrés por metales pesados	119
4.5.3.4.	Crecimiento en condiciones de limitación de hierro	120
4.5.3.5.	Movilidad/quimiotaxis	121
4.5.3.6.	Análisis de la expresión de genes involucrados en el proceso de biofilms por RT-PCR cuantitativa en el fondo silvestre y mutantes <i>cbrB</i>	122
4.5.4.	Caracterización molecular de los mutantes <i>cbrB</i> de inserción y delección.	123
4.5.4.1.	Reversión de la estirpe MPO406 a un genotipo silvestre	124
4.5.4.2.	Identificación de la existencia de un péptido de bajo peso molecular de la proteína CbrB en el mutante MPO406.....	125
4.5.4.3.	Cuantificación de la expresión de <i>cbrB</i> y los genes adyacentes en los mutantes MPO401 y MPO401 mediante RT-qPCR	126
4.5.4.4.	Caracterización de los elementos identificados en el mutante MPO406, que provocan una superproducción y falta de dispersión de biofilms.....	130

4.5.4.4.1. Complementación <i>en trans</i> del mutante MPO401 con versiones truncadas de la proteína CbrB en multicopia.....	131
4.5.4.4.2. Superproducción del RNA pequeño <i>crcZ</i> bajo un promotor heterólogo en KT2442 y MPO401	134
4.6. Capítulo 6: Análisis de la regulación por CbrB de los RNAs pequeños CrcZ y CrcY.....	136
4.6.1. Análisis de la expresión de los pequeños RNA CrcZ y CrcY en la estirpe silvestre y mutantes MPO406 y MPO401	136
4.6.2. Mapeo del sitio de inicio de la transcripción de los pequeños RNA CrcY y CrcZ en las estirpes silvestre y MPO401 ($\Delta cbrB$)	138
4.6.3. Construcción de un mutante nulo de <i>crcZ</i> y caracterización de sus fenotipos.	140
4.6.3.1. Construcción del mutante de delección de $\Delta crcZ$	140
4.6.3.2. Análisis del crecimiento del mutante MPO456 ($\Delta crcZ$) en condiciones de represión y no represión catabólica	141
5. DISCUSIÓN	142
5.1. El papel de CbrB en la la regulación del metabolismo de carbono en <i>Pseudomonas putida</i>	144
5.2. Efecto regulador de CbrB sobre otros procesos celulares.....	152
5.2.1. CbrB y la movilidad en <i>P. putida</i>	153
5.2.2. La regulación de la respuesta a estrés ejercida por CbrB	154
5.2.3. CbrB en el mapa regulador de <i>P. putida</i>	157
5.3. Estudio de la organización genómica y regulación del sistema CbrA-CbrB.....	157
5.4. Interacción del sistema CbrAB con el proceso de represión catabólica mediado por los RNAs pequeños CrcZ y CrcY	158
5.5. Análisis de la formación y dispersión de biofilms por la estirpe MPO406	160
6. CONCLUSIONES.....	166
7. ANEXO	169
8. BIBLIOGRAFÍA.....	185

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación de reguladores de respuesta en distintas bacterias	15
Tabla 2. Clasificación de proteínas de transducción de señales en distintas bacterias	15
Tabla 3. Estirpes	33
Tabla 4. Plásmidos	35
Tabla 5. Oligonucleótidos	36
Tabla 6. Resultados del estudio fenotípico mediante el Biolog <i>Phenotypic Microarray</i>	74
Tabla 7. Validación mediante RT-qPCR de la expresión de determinados genes en las condiciones ensayadas para los <i>microarrays</i>	85
Tabla 8. Cuantificación de los biofilms de <i>P. putida</i> y mutante MPO406 después de un tratamiento con Proteinasa K y Metaperyodato de sodio	104
Tabla 9. Crecimiento de <i>P. putida</i> KT2442 y mutantes <i>cbrB</i> en distintas fuentes de carbono	119
Tabla S1. Genes con expresión diferencial en <i>P. putida</i> KT2442 vs. mutante <i>cbrB</i> (MPO406) en L-aminoácidos	170
Tabla S2. Genes con expresión diferencial en el mutante <i>ntrC</i> (MPO201) vs. mutante <i>cbrBntrC</i> (MPO400)	173
Tabla S3. Intersección de los genes con expresión diferencial en los dos análisis por <i>microarrays</i> realizados en esta tesis	176
Tabla S4. Listado de los genes diferencialmente expresados en el array 1 y/o 2, ordenados en categorías	177
Tabla S5. Intersección de los regulones de CbrB y Crc de <i>P. putida</i>	182
Tabla S6. Datos crudos obtenidos mediante Phenotype Microarrays	183

Índice de figuras

Figura 1. Esquema de un sistema de dos componentes típico	17
Figura 2. Arquitectura de dominios en distintas HKs	18
Figura 3. Esquema de las regiones promotoras de tipo σ^N y la formación de complejo iniciador de la transcripción	20
Figura 4. Arquitectura de dominios en EBPs	21
Figura 5. Metabolismo del carbono en <i>P. putida</i>	25
Figura 6. Activación de pequeños RNAs por CbrB en <i>P. putida</i>	29
Figura 7. Esquema de un sistema de cámaras de flujo.	42
Figura 8. Esquema de una cámara de flujo	42
Figura 9. Crecimiento de <i>P. putida</i> KT2442 y mutantes <i>cbrB</i> (MPO406), <i>ntrC</i> (MPO201) y <i>cbrBntrC</i> (MPO400) en un medio definido utilizando histidina como fuente de nitrógeno (A), carbono (B) y carbono y nitrógeno (C).	68
Figura 10. Crecimiento de <i>P. putida</i> KT2442 y mutantes <i>cbrB</i> (MPO406), <i>ntrC</i> (MPO201) y <i>cbrBntrC</i> (MPO400) en un medio definido utilizando arginina como fuente de nitrógeno (A), carbono (B) y carbono y nitrógeno (C)	68
Figura 11. Crecimiento de <i>P. putida</i> KT2442 y mutantes <i>cbrB</i> (MPO406), <i>ntrC</i> (MPO201) y <i>cbrB ntrC</i> (MPO400) en un medio definido utilizando ornitina como fuente de nitrógeno (A), carbono (B) y carbono y nitrógeno (C)	69
Figura 12. Crecimiento de <i>P. putida</i> KT2442 y mutantes <i>cbrB</i> (MPO406), <i>ntrC</i> (MPO201) y <i>cbrB ntrC</i> (MPO400) en un medio definido utilizando tirosina como fuente de nitrógeno (A), carbono (B) y carbono y nitrógeno (C)	76
Figura 13. Crecimiento de <i>P. putida</i> KT2442 y mutantes <i>cbrB</i> (MPO406), <i>ntrC</i> (MPO201) y <i>cbrBntrC</i> (MPO400) en un medio definido utilizando prolina como fuente de nitrógeno (A), carbono (B) y carbono y nitrógeno (C)	71
Figura 14. Crecimiento de <i>P. putida</i> KT2442 y mutantes <i>cbrB</i> (MPO406), <i>ntrC</i> (MPO201) y <i>cbrBntrC</i> (MPO400) en un medio definido utilizando glutamato como fuente nitrógeno (A), carbono (B) y carbono y nitrógeno (C)	72

Figura 15. Crecimiento de <i>P. putida</i> KT2442 y mutantes <i>cbrB</i> (MPO406), <i>ntrB</i> (MPO201) y <i>cbrB ntrC</i> (MPO400) en un medio definido con citrato (A) y succinato (B) como fuente de carbono	73
Figura 16. Crecimiento de <i>P. putida</i> KT2442 y mutantes <i>cbrB</i> , <i>ntrC</i> y <i>cbrB ntrC</i> en un medio LB y LB diluido	76
Figura 17. Crecimiento de <i>P. putida</i> y mutante <i>cbrB</i> (MPO406) en un medio definido con casaminoácidos como fuente de C y N	77
Figura 18. Crecimiento de <i>P. putida</i> KT2442 y mutante <i>cbrB</i> (MPO406) en un medio definido con L-aminoácidos como fuente de carbono y nitrógeno	78
Figura 19. Crecimiento de <i>P. putida</i> en un medio mínimo con distintas fuentes de carbono	79
Figura 20. Genes con expresión diferencial en <i>P. putida</i> KT2442 frente al fondo <i>cbrB</i> (MPO406) en L-aminoácidos	81
Figura 21. Genes con expresión diferencial en el mutante <i>ntrC</i> (MPO201) en comparación con la estirpe <i>cbrBntrC</i> (MPO400) creciendo en un medio definido con L-aminoácidos	82
Figura 22. Medida de la expresión de <i>cbrB</i> por RT-qPCR en <i>P. putida</i> KT2442	87
Figura 23. Identificación del inicio de transcripción de <i>cbrB</i>	88
Figura 24. Identificación del inicio de transcripción de <i>cbrB</i> mediante <i>primer extension</i> con un plásmido de expresión que contiene <i>cbrB</i>	89
Figura 25. Ensayos de movilidad por <i>swimming</i> en agar blando	91
Figura 26. Ensayos de movilidad por <i>swarming</i> en agar blando.	92
Figura 27. Visualización de flagelo por microscopía.	93
Figura 28. Resistencia a metales pesados en dilución en gota.	94
Figura 29. Conteo de viables en presencia de metales pesados.	95
Figura 30. Capacidad de crecimiento en medio limitado en hierro (Fe^{2+})	97
Figura 31. Adhesión a microplacas por <i>P. putida</i> en distintos medios	99
Figura 32. Sedimentación de <i>P. putida</i> silvestre y mutante <i>cbrB</i> en cultivo estático	100
Figura 33. Formación de películas en el <i>P. putida</i> KT2442 y en el mutante MPO406	101
Figura 34. Tratamiento enzimático de un biofilm en el mutante MPO406	102
Figura 35. Tratamiento de los biofilms de las estirpes silvestre y MPO406 con Proteínasa K (Panel A) y metaperyodato sódico (Panel B) en microplaca	103
Figura 36. Visualización de una imagen de microscopía confocal XYZ.	106
Figura 37. Dinámica de formación de biofilms en cámaras de flujo	106
Figura 38. Tratamiento con SDS 0,1 % de biofilms tempranos	107
Figura 39. Dispersión de biofilms en cámaras de flujo por cese del suministro de flujo	108
Figura 40. Efecto de la adición de SDS 0,01 % sobre biofilms maduros	109
Figura 41. Efecto de SDS 0,1 % sobre biofilms maduros	110
Figura 42. Tratamiento de biofilms maduros con colistina 0'5 µg/ml	111
Figura 43. Tratamiento de biofilms maduros con colistina 1 µg/ml	111
Figura 44. Ensayo de competencia en la colonización de biofilms en un cultivo mixto en proporción 1:1 (silvestre: <i>cbrB</i>)	113
Figura 45. Ensayo de competencia en la colonización de biofilms cultivo mixto en proporción 9:1 (silvestre: MPO406)	114
Figura 46. Ensayo de competencia por la colonización de biofilms con una diferencia en la inoculación de la estirpe MPO406 de 24 horas respecto a la estirpe silvestre	115
Figura 47. Determinación de la orientación del transposón en la estirpe MPO406	116
Figura 48. Formación de biofilms por <i>P. putida</i> y mutantes <i>cbrB</i>	118
Figura 49. Resistencia a metales pesados en dilución en gota en <i>P. putida</i> y mutantes <i>cbrB</i>	120
Figura 50. Crecimiento de <i>P. putida</i> silvestre y estirpes mutantes MPO406 y MPO401 en condiciones de limitación de hierro	121
Figura 51. Movilidad en agar blando	122
Figura 52. Cuantificación de la expresión de genes involucrados en el proceso de biofilms en	123

P. putida KT2442, MPO406 y MPO401.

Figura 53. Curva de formación-dispersión de biofilms en candidatos revertientes	124
Figura 54. Identificación de un péptido de bajo peso molecular en MPO406 por western blotting	126
Figura 55. Representación esquemática de la organización genómica de la región cercana a <i>cbrB</i> para <i>P. putida</i> KT2442 silvestre y mutantes MPO406 y MPO401	127
Figura 56. Cuantificación de la expresión de <i>cbrB</i> , <i>crcZ</i> y <i>pcnB</i> por RT-PCR cuantitativa en <i>P. putida</i> KT2442, MPO406 y MPO401	128
Figura 57. Determinación del extremo 5' de <i>crcZ</i> mediante análisis de <i>Primer extension</i>	129
Figura 58. Medida de la expresión de <i>cbrB</i> por RT-qPCR en <i>P. putida</i> KT2442	130
Figura 59. Diseño de versiones truncadas de CbrB para complementación <i>en trans</i>	131
Figura 60. Análisis de la formación de biofilms por las estirpes silvestre y mutantes MPO401 y MPO406 complementados con las versiones truncadas de CbrB	133
Figura 61. Representación de los insertos para sobexpresar CrcZ de forma heteróloga en el vector de expresión pJB3Km-1	134
Figura 62. Cuantificación de la expresión de <i>crcZ</i> por RT-PCR cuantitativa	135
Figura 63. Medida de la expresión de <i>crcZ</i> mediante RT-PCR cuantitativa	137
Figura 64. Cuantificación de la expresión de <i>crcY</i> mediante RT-PCR cuantitativa	138
Figura 65. Determinación del sitio de inicio de la transcripción de <i>crcZ</i> mediante análisis de <i>Primer extensión</i> en la estirpe silvestre y mutante MPO401	139
Figura 66. Determinación del sitio de inicio de la transcripción de CrcY por primer extension.	140
Figura 67. Análisis del crecimiento de las estirpes silvestre y mutante Δ <i>crcZ</i> en un medio mínimo con distintas fuentes de carbono	141
Figura 68. Rutas de asimilación de arginina y ornitina en <i>P. putida</i>	147
Figura 69. Genes regulados por CbrB involucrados en el metabolismo de aminoácidos y otras fuentes de carbono.	150
Figura 70. Modelo de regulación global por CbrAB en <i>P. putida</i>	165
Figura S1. Actividad metabólica <i>P. putida</i> KT2442 silvestre y MPO406 con múltiples fuentes de carbono y nitrógeno	184

ABREVIATURAS

ABS: absorbancia (nm)
ADP: adenosina difosfato
ATP: adenosina trifosfato
BSA: Albúmina de suero bovino (*bovine serum albumin*)
C: carbono
CFP: proteína fluorescente cian (*cyan fluorescent protein*)
cpm: cuentas por minuto
DEPC: dietilpirocarbonato
DMSO: dimetil sulfóxido
dNTP: desoxinucleótido trifosfato
DTT: ditioneitol
EBP : *enhancer binding protein*
EDTA: ácido etilendiaminetetracético
GFP: proteína fluorescente verde (*green fluorescent protein*)
HK: histidina quinasa (histidine-kinase)
IHF: factor de integración de hospedador (*integration host factor*)
Kb: kilobase
LB: medio Luria-Bertani
MM: medio mínimo
N: nitrógeno
PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida (*poly-acrylamide gel electrophoresis*)
pb: par de bases
PCR: reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*)
PEG: polietilenglicol
Pm: peso molecular
p/v: relación peso/volumen
RC: represión catabólica
RR: regulador de respuesta (*response regulator*)
RT: retrotranscripción
RT-qPCR: PCR cuantitativa a tiempo real
SDS: dodecil sulfato (*sodium dodecyl sulfate*)
 σ : factor sigma
TAE: Tris-acetato-EDTA
TBE: Tris-borato-EDTA
TCS: sistema de dos componentes (*two-component system*)
TE: Tris-EDTA
TEMED: N,N,N,N'-tetrametiletilendiamina
TER: Tris-EDTA-RNasa
UTasa/UR: uridilil transferasa/uridilil liasa
v/v: relación volumen/volumen
YFP: proteína fluorescente amarilla (*yellow fluorescent protein*)

1. INTRODUCCIÓN

Las bacterias de origen medioambiental pueden colonizar nichos muy diferentes debido a que pueden adaptarse a condiciones cambiantes a través de modificaciones en su metabolismo, fisiología y comportamiento. Esta capacidad es el resultado de una acción coordinada de sistemas reguladores que se activan en respuesta a estímulos o señales ambientales y/o fisiológicas para controlar aspectos metabólicos, fisiológicos y de comportamiento que permiten a la célula prosperar en las nuevas condiciones. Las bacterias de suelo del género *Pseudomonas* poseen un alto número de sistemas reguladores, probablemente debido a su exposición continua a condiciones ambientales sujetas a cambios constantes.

1.1. El género *Pseudomonas*

Las bacterias del género *Pseudomonas* pertenecen a la subclase gamma de Proteobacterias y son bacilos Gram-negativos quimiorganotrofos aerobios, móviles gracias a uno o varios flagelos polares. Presentan un metabolismo principalmente respiratorio en el que el oxígeno es el aceptor final de electrones, aunque en algunos casos, el nitrato puede ser empleado como un aceptor alternativo (Palleroni y Moore, 2004). Las bacterias de este género son ubícuas y pueden encontrarse en ambientes aeróbicos y microaeróbicos tanto en suelos como en agua. Además, poseen requerimientos nutricionales sencillos y son capaces de crecer de forma rápida en condiciones normales de laboratorio.

El género *Pseudomonas* es un género muy amplio, con un gran número de especies, y todas comparten una amplia versatilidad metabólica, fisiológica y genética que hace posible que colonicen con éxito una gran variedad de nichos. Las bacterias de este grupo participan en muchas actividades de importancia biotecnológica, medioambiental y biosanitaria, como el reciclaje de elementos, la interacción y protección frente a patógenos en las raíces de plantas, la síntesis de polímeros de interés, la degradación de compuestos orgánicos de todo tipo, tanto xenobióticos como biogénicos o la producción de enfermedades tanto en animales como en plantas (Timmis, 2002). Además, muchas de ellas poseen resistencias a antibióticos, metales pesados o gran tolerancia a solventes orgánicos que en otras bacterias disgregarían las membranas (Ramos y col., 2002). Además es frecuente encontrar los genes del metabolismo de hidrocarburos y los responsables de las resistencias a diversos agentes codificados en plásmidos transmisibles y transposones (Jacoby y Matthew, 1979; Boronin, 1992; Tsuda, 1996). La presencia de elementos transmisibles es habitual en las pseudomonas, y la transferencia horizontal de información genética se produce con cierta frecuencia entre estirpes de esta especie y otras relacionadas.

1.1.1. *Pseudomonas putida* como modelo de bacteria ambiental

Pseudomonas putida es una bacteria de crecimiento rápido que se encuentra habitualmente en suelos y aguas de carácter templado. Se ha convertido en el paradigma de bacteria del suelo metabólicamente versátil capaz de degradar una amplia variedad de contaminantes orgánicos en compartimentos aeróbicos del medio ambiente, particularmente hidrocarburos aromáticos y alifáticos, ejerciendo por tanto un papel clave en el mantenimiento de la calidad del ambiente. Con frecuencia aparece como el organismo predominante en cultivos de enriquecimiento en los que se utiliza un compuesto recalcitrante como única fuente de carbono y energía, probablemente debido a que las condiciones usualmente utilizadas en estos enriquecimientos (alta aireación, disponibilidad de minerales, temperatura de incubación de entre 20 y 30 °C, etc) favorecen el rápido crecimiento de *P. putida*. Buena parte de las capacidades degradadoras de compuestos recalcitrantes de *P. putida* residen precisamente en plásmidos, con actividades que canalizan estos compuestos hacia el metabolismo central de la célula, siendo ampliamente estudiados plásmidos como el plásmido TOL pWWO (de degradación de tolueno y xilenos) (Williams y Murray, 1974), el plásmido NAH7 (Dunn y Gunsalus, 1973) y el plásmido CAM (Rheinwald y col., 1973), que codifican para el catabolismo de tolueno/xilenos, naftaleno y cámbor, respectivamente. Además, las estirpes de *P. putida* también poseen en el cromosoma rutas catabólicas de una gran variedad de compuestos orgánicos, tanto productos naturales como metabolitos producidos por la degradación parcial de otros compuestos, como por ejemplo la lignina (Jimenez y col., 2002; Nelson y col., 2002). Además, dado que *P. putida* no es patógena de animales o vegetales, hace que estas especies saprófitas sean consideradas inocuas ambientalmente. Por esta razón, *P. putida* fue reconocida como una prometedora candidata para desarrollar un estirpe segura para experimentos de DNA recombinante para aplicaciones ambientales, y constituye una excelente herramienta de laboratorio para investigar las bacterias de suelo y los procesos en los que están implicadas (Timmis, 2002).

La estirpe KT2440 de *P. putida* deriva de *Pseudomonas arvilla* mt-2, la bacteria degradadora de tolueno mejor caracterizada y que fue posteriormente reclasificada como *P. putida* mt-2 (Bagdasarian y col., 1981);(Williams y Murray, 1974). Esta especie contiene el plásmido TOL pWWO que codifica la ruta del catabolismo oxidativo de tolueno y xilenos. Se ha desarrollado un amplio espectro de herramientas genéticas para su análisis, manipulación y uso como hospedador de genes procedentes de otros organismos de origen ambiental (Mermod y col., 1986; Herrero y col., 1990; de Lorenzo y Timmis, 1994). También se ha desarrollado una variante resistente a Rifampicina denominada KT2442, que ha sido la estirpe empleada a lo largo de esta Tesis Doctoral. La estirpe *P. putida* KT2440, además, ha sido utilizada en el desarrollo de modificaciones en distintas rutas de

degradación de contaminantes aromáticos (Ramos y col., 1986; Ramos y col., 1987; Rojo y col., 1987; Erb y col., 1997), bioprotección a compuestos tóxicos como el fenol (Ramos y col., 1986; Ramos y col., 1987; Rojo y col., 1987; Erb y col., 1997), así como biocatalizador en procesos como la biodesulfuración (Galan y col., 2000). Además, KT2440 también es capaz de colonizar la rizosfera de una amplia variedad de cultivos vegetales, como maíz, trigo, fresa, caña de azúcar y espinaca y ha sido usada para desarrollar nuevos biopesticidas y promotores del crecimiento de plantas que funcionan en la rizosfera de plantas (Espinosa-Urgel y col., 2002).

La secuenciación del genoma de *P. putida* KT2440 (Nelson y col., 2002) supuso una gran avance para el desarrollo de nuevas aplicaciones biotecnológicas, ya que reveló la presencia de una gran cantidad de genes que codificaban posibles transportadores de diversos compuestos, actividades mono y dioxigenasas, oxidorreductasas, ferredoxinas y citocromo oxidasas, dehidrogenasas, enzimas del metabolismo del azufre, entre otras, y de bombas de glutatión-S-transferasas, asociadas con la protección contra sustratos tóxicos y metabolitos. La integración de la información genética con el estado fisiológico de la célula le permite ajustar una compleja red reguladora que controla el metabolismo celular y adaptarse al medio ambiente.

1.1.2. La regulación de la expresión génica en *Pseudomonas*.

Aproximadamente el 10 % de los genes de *P. putida* KT2440 codifican productos involucrados en transducción de señales y regulación de la expresión génica. Entre esas proteínas, existen 94 reguladores de respuesta pertenecientes a sistemas de dos componentes. Recientemente, Galperin realizó un análisis *in silico* de los reguladores de respuesta (RRs) de 896 genomas bacterianos y de arqueas, agrupando el número de reguladores por familias según el contenido de dominios receptores (REC) (Galperin, 2010). En la tabla 1 se resumen los reguladores pertenecientes al género *Pseudomonas* cuyos genomas están totalmente secuenciados. Como puede observarse, los reguladores más numerosos son los que contienen dominios de unión a DNA (67-77 %), con un número que oscila entre 41 (*P. stutzeri*) y 69 (*P. fluorescens*). El número de reguladores presentes en *Pseudomonas* es notablemente alto si se compara con los de *E. coli* (46 frente a 29), lo que parece indicar un control más especializado de la transcripción. Además, mientras que en *P. putida* se han identificado 10 reguladores que además poseen actividad enzimática en su genoma, en *E. coli* se ve reducida la cifra a tan sólo uno. Estas diferencias reflejan que las pseudomonas poseen un sistema regulador más complejo que las enterobacterias.

Número de reguladores de respuesta																	
Estirpe	REC	Unión DNA					RNA	Enzimáticos						CheV	Otros	Todos	
		OmpR	NarL	NtrC	LytR	ActR		GGDEF	FimX	PvrR	RpfG	HisK	PP2C				CheB
		<i>P. aeruginosa</i>	6	24	16	8	1	1	1	3	1	1	2		2		4
<i>P. entomophila</i>	9	22	11	8	1	1	1	2	1			1	2	2	3	6	70
<i>P. fluorescens</i>	11	29	18	9	1	1		2	2	3	3	2	2	2	3	4	92
<i>P.mendocina</i>	7	14	12	7	1	1	1	4	2		3	1	1	2	4	3	63
<i>P. putida</i>	11	25	11	8	1	1	1	2	1		1	2	2	2	3	4	75
<i>P.stutzeri</i>	9	15	7	8	1	1	1	3	1		1	1	1	1	2	2	54
<i>P.syringae</i>	11	19	12	8	1	1	1	2	2	1		1	2	3	3	4	71
<i>E. coli</i>	1	14	9	4	2									1		1	32

Tabla 1. Clasificación de reguladores de respuesta en distintas bacterias (modificado de Galperin 2010, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Complete_Genomes/RRcensus.html). Los RR se agruparon en distintas categorías en función de los dominios presentados; dominio receptor (REC), de unión a DNA, RNA o dominios con actividad enzimática, u otros. Los nombres de las familias fueron asignados tras la primera proteína caracterizada con la misma arquitectura de dominios.

Según la clasificación de Galperin, las proteínas de transducción de señales más abundantes en el género *Pseudomonas* son aquéllas con dominios histidina-quinasa (HK), que resultaron ser alrededor del 50 % de las proteínas sensoras y que además se correspondían con el mismo número de RRs en las distintas especies. De nuevo, *E. coli* presentó la mitad de proteínas tipo HK que las especies de *Pseudomonas* (Tabla 2).

Estirpe	Número de proteínas de transducción de señales												
	Hisk	MCP	GGDEF	GGDEF +EAL	EAL	HD-GYP	ACI	AC3	STYK	PP2C	RRs	Todos	
<i>P. aeruginosa</i>	63	26	17	16	6	3	1	1	8	6	64	210	
<i>P. entomophila</i>	61	32	19	19	2		1		6	4	64	208	
<i>P. fluorescens</i>	80	42	21	19	10	4	1		5	3	78	263	
<i>P. mendocina</i>	51	30	28	20	4	6	1	1	5	6	52	204	
<i>P. putida</i>	67	27	19	17	3	2	1		5	3	67	211	
<i>P. stutzeri</i>	66	22	19	14	3	2	1	1	6	7	47	199	
<i>P. syringae</i>	69	48	16	19	2	1	1		6	4	63	231	
<i>E. coli</i>	30	5	12	7	10		1		2		32	99	

Tabla 2. Clasificación de proteínas de transducción de señales en distintas bacterias (modificado de Galperin 2010, Mol. Biosystems, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Complete_Genomes/SignalCensus.html). Se recogen las proteínas sensoras clasificadas en distintas categorías. HisK: histidina quinasa; MCP: methyl-accepting chemotaxis protein; GGDEF: dominio con actividad diguanilato ciclasa; GGDEF+EAL: dominios GGDEF+EAL presentes; EAL: dominio con actividad fosfodiesterasa; HD-GYP: ; AC1: dominio actividad adenilato ciclasa tipo I; AC3: dominio de actividad diguanilato ciclasa tipo III; STYK: dominio serina/treonina-proteína quinasa; PP2C: dominio con actividad fosfatasa; RRs: reguladores de respuesta; todos: suma de proteínas sensoras+reguladores respuesta.

El número de genes que codifican reguladores de respuesta y proteínas de transducción de señales en los genomas de las pseudomonas y su comparación con las de las enterobacterias (con *E. coli* como representante del grupo), permite predecir que la complejidad de la red de regulación en este género es la base para su enorme potencial de adaptabilidad a distintas condiciones metabólicas, fisiológicas y ambientales y, en definitiva, de su versatilidad.

1.1.3. Regulación de promotores dependientes de σ^N mediada por sistemas de dos componentes.

1.1.3.1. Sistemas reguladores de dos componentes

Los sistemas de dos componentes (TCS) sirven como un mecanismo básico para acoplar un estímulo a una respuesta y permitir que los organismos detecten y respondan a cambios en distintas condiciones ambientales (West y Stock, 2001). Aunque la naturaleza de los estímulos y las respuestas es muy diversa, los mecanismos moleculares empleados en la señalización convergen en una fosforilación específica de residuos conservados. Aunque los TCS se han descrito en eubacterias, arqueas y eucariotas, los sistemas de transferencia de fósforo de tipo His-Asp están representados en la mayoría de las rutas de señalización de eubacterias, pero son raros en eucariotas, donde predominan las cascadas de señalización que implican fosforilación vía residuos de Ser/Thr/Tyr (Stock y col., 2000).

Un TCS típico está compuesto por una proteína sensora tipo histidina-quinasa (HK) que detecta un estímulo generalmente extracitosólico y lo transmite mediante un evento de fosforilación a un regulador de respuesta (RR) citoplasmático (Figura 1). Las HKs pueden contener varios dominios transmembrana en su extremo N-terminal que la mantienen anclada a la membrana periplásmica, y a veces están implicados en la detección de la señal activadora, pero siempre presentan un dominio autoquinasa citoplasmático en el extremo C-terminal, que contiene un residuo de histidina conservado susceptible de ser fosforilado. En ocasiones, es posible encontrar otros módulos accesorios (dominios PAS, HAMP, etc) o incluso varios de estos módulos repetidos en las HKs complejas (Figura 2). Por otra parte, la proteína reguladora de la respuesta (RR) se compone habitualmente de un dominio regulador N-terminal que contiene un residuo de aspártico

conservado, y un dominio efector de la respuesta en el C-terminal con un motivo HTH de unión a DNA.

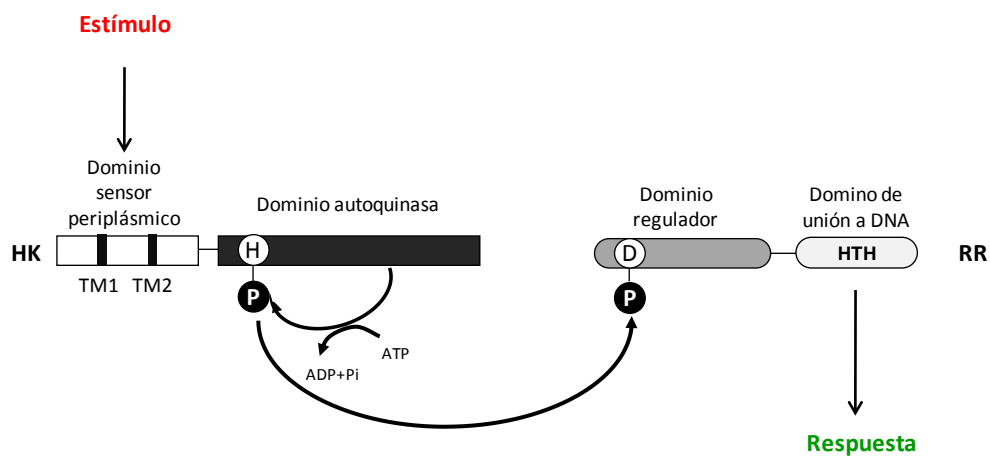


Figura 1. Esquema de un sistema de dos componentes típico. Se presenta la estructura en dominios del elemento sensor y regulador de un sistema de dos componentes, así como el flujo de fosfato entre dominios y proteínas. **HK**: sensor histidina-quinasa; se compone de un dominio N-terminal con regiones transmembrana (TM1 y TM2) que detecta el estímulo ambiental, y un dominio C-terminal donde reside el residuo de histidina que recibe la fosforilación, catalizada por actividad autoquinasa dependiente de la unión de ATP. **RR**: regulador de respuesta, compuesto por un dominio N-terminal con un residuo de aspártico fosforilable y un dominio efector, que generalmente es de unión a DNA (helix-turn-helix), que desencadena la respuesta.

La activación del TCS se inicia con la detección de una señal por la HK, que provoca la fosforilación del residuo de histidina conservado, mediante la actividad autoquinasa. Esta reacción requiere de la hidrólisis de una molécula de ATP. A continuación, se produce la transfosforilación del residuo de aspártico conservado en el RR, provocando la activación del dominio efector, y generando la respuesta adaptativa adecuada al estímulo (Stock y col., 2000). Además se produce la defosforilación del elemento RR, limitando así el tiempo de vida de su estado activo (Stock y col., 2000).

Las HKs, como elementos sensores de los TCS, han adaptado sus mecanismos de detección para responder a la amplia variedad de estímulos ambientales, que comprenden desde una molécula o metabolito en concreto (citrato, quimioatrayente), una relación entre metabolitos (2-KG/Gln), un compuesto aromático (bifenilo o compuestos monoaromáticos) o incluso la temperatura que provoca una modificación en la membrana (Krell y col., 2010) y referencias incluidas). Esta diversidad de estímulos detectados por las distintas HKs queda reflejado en la variedad de dominios sensores, en ocasiones duplicados, que contienen (Figura 2).

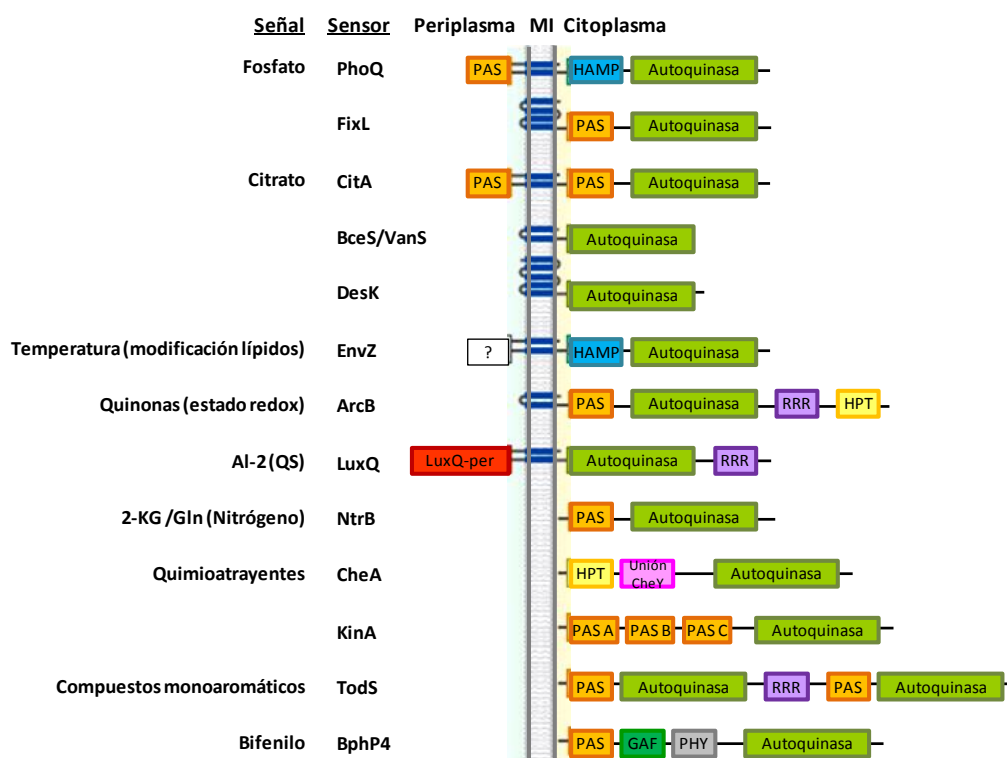


Figura 2. Arquitectura de dominios en distintas HKs. Se representan los diferentes dominios existentes en diversas HKs descritas, donde los dominios transmembrana se representan como barras azules en la membrana interna (MI). También se incluye la señal que detectan tales HKs. Abreviaturas: MI, membrana interna; 2-KG, 2-oxoglutarato; Gln es glutamina; RRR, *response regulator receiver*; HPT, *histidine containing phosphotransfer*; GAF, dominio GAF; PHY, fitocromo; PAS y HAMP, dominios PAS y HAMP. Modificada de Krell y col. (Krell y col., 2010).

1.1.3.2. Activación de promotores de tipo σ^N

La transcripción génica en bacterias es llevada a cabo por la RNA polimerasa (RNAP) que consta de 5 subunidades ($\alpha 2\beta\beta'\omega$) que constituyen el denominado núcleo o *core*, y que dirigen el proceso de elongación y terminación de la transcripción. Sin embargo, para la iniciación de la transcripción se requiere de una unidad adicional denominada factor σ y que constituye junto al *core* la denominada holoenzima. El factor σ es responsable del reconocimiento de las secuencias promotoras en el DNA para el inicio de la transcripción (Buck y col., 2000). Todas las bacterias poseen un factor σ vegetativo asociado a la RNAP que dirige la transcripción de la mayoría de los promotores, y que se denomina σ^{70} . La mayoría de bacterias codifican además factores σ alternativos que dirigen a la RNAP hacia distintos grupos de promotores (Gruber y Gross, 2003). El número de factores σ alternativos varía considerablemente entre las distintas especies, y a menudo refleja el estilo de vida de la bacteria (Kill y col., 2005). Mientras que *P. putida* y *P. aeruginosa* poseen 24 factores σ , *E. coli* sólo tiene 7 (Martinez-Bueno y col., 2002), lo que refleja que el entorno en el que se desenvuelven las primeras es muy variable: bacterias de suelos (contaminados o no

contaminados) o ambientes acuosos con condiciones físico-químicas y nutricionales fluctuantes frente bacterias entéricas con temperatura constante y suministro continuo de nutrientes.

Los factores σ alternativos se dividen en dos principales familias en función de su naturaleza molecular y modo de acción: σ^{70} y σ^N . La primera familia comprende a la subfamilia de σ^{70} y factores de función extracitoplasmática (ECFs), entre los que se incluyen el propio σ^{70} , σ^S (implicado en la respuesta a diversos estreses); σ^{32} (que actúa ante un plegamiento erróneo de proteínas) o σ^F (involucrado en la síntesis de flagelo) (Helmann y Chamberlin, 1988; Helmann, 1991; Kundu y col., 1997; Paget y Helmann, 2003). La holoenzima asociada a un factor tipo σ^{70} reconoce y se une a unas secuencias conservadas en el promotor centradas en las posiciones -35 y -10 respecto al sitio de inicio de la transcripción, cuyas secuencias de reconocimiento son TTGACA y TATAAT, respectivamente (Domínguez-Cuevas y Marqués, 2004). Es importante reseñar que en general la RNA polimerasa con un factor tipo σ^{70} puede por sí sola iniciar la transcripción.

Por otro lado, la familia de factores sigma alternativos σ^N comprende solamente un grupo y se encuentra codificado en copia única en los genomas bacterianos (*rpoN*). La holoenzima asociada al factor σ^N reconoce secuencias centradas en las posiciones -24 y -12 respecto al inicio de transcripción, con el consenso TGGCAC(A/G)-N4-TTGC(A/T), donde las posiciones GG-N₁₀-GC son imprescindibles para el reconocimiento (Barrios y col., 1999) (Figura 3A). En el caso de la activación de los promotores dependientes del factor σ^N , la unión de la holoenzima al DNA provoca la formación del complejo cerrado, pero el paso a complejo abierto no ocurre espontáneamente, sino que requiere el concurso de la proteína activadora que se une a secuencias específicas localizadas en una posición remota del sitio de inicio de la transcripción (aproximadamente 100-150 pb), conocidas como *upstream activating sequences* o UAS (Buck y col., 2000). El proceso de activación, que implica el paso de complejo cerrado a complejo abierto, requiere la interacción de la proteína activadora con el núcleo de la RNAP- σ^N y la hidrólisis de ATP (Zhang y col., 2002). La interacción se lleva a cabo cuando el activador y la RNAP- σ^N se encuentran unidas a sus respectivos sitios en el DNA, con la consiguiente formación de un lazo en el DNA. El lazo puede formarse puramente al azar o verse favorecido por una curvatura en el DNA que puede ser intrínseca (Carmona y col., 1997), pero que en ocasiones es producida por proteínas como IHF o HU que se asocian a este tipo de promotores (Figura 3) (Hoover y col., 1990; Perez-Martin y De Lorenzo, 1995). A diferencia de lo que ocurre en la iniciación de la transcripción mediada por el factor σ^{70} , la activación de promotores tipo σ^N requiere la estricta presencia del activador (Reitzer y Schneider, 2001).

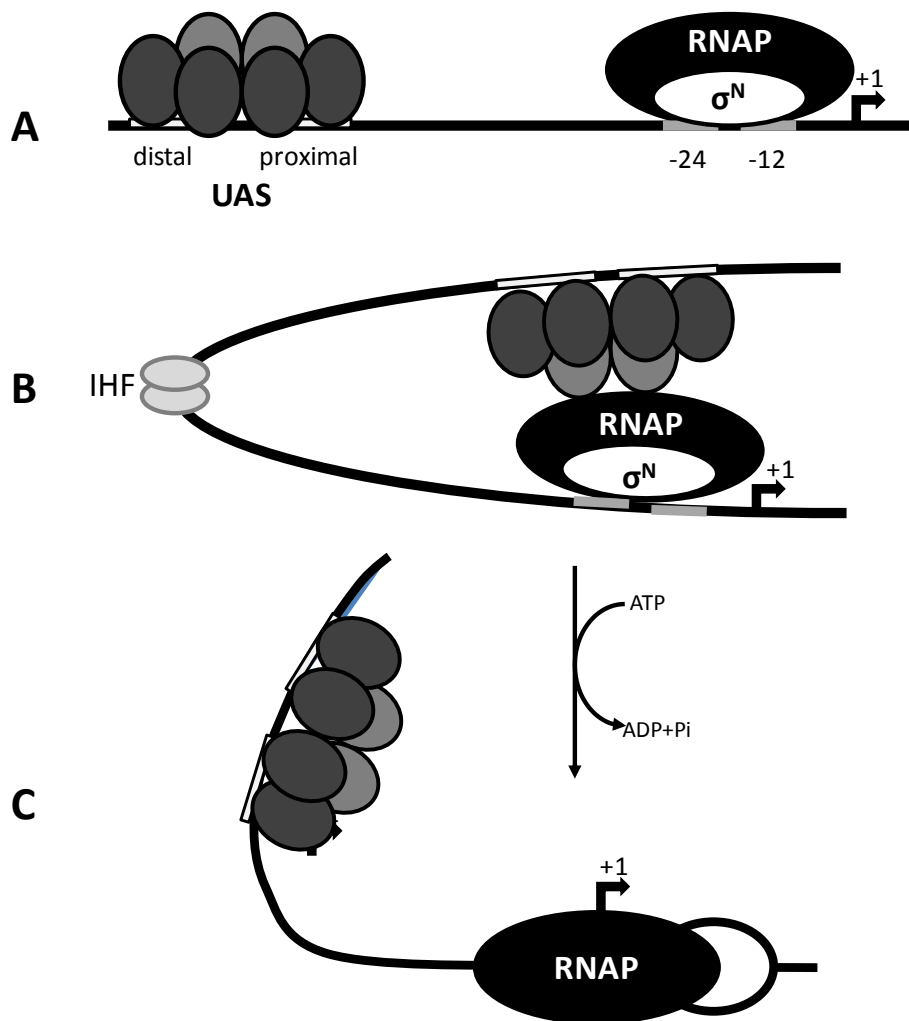


Figura 3. Esquema de las regiones promotoras de tipo σ^N y la formación de complejo iniciador de la transcripción. Se muestra la región que reconoce la RNA polimerasa asociada a σ^N con sus cajas conservadas -24 y -12 y los sitios de unión del activador (UAS) (A). Se muestra además el mecanismo de activación de estos promotores, por unión de la RNA polimerasa- σ^N a su sitio de unión y del activador tipo EBP a las UAS y la formación de complejo cerrado, siendo IHF una proteína de unión a DNA que estabiliza la formación del complejo (B), y su transición a complejo abierto con la consecuente hidrólisis de ATP (C). El inicio de la transcripción se representa con la fecha que indica +1.

Los activadores dependientes de σ^N constan en general de tres dominios: un dominio amino-terminal o dominio A, implicado en la recepción de señales que presenta una gran variabilidad, un dominio central que contiene la actividad ATPasa necesaria para la activación y en el que se produce la interacción entre el activador y el factor σ^N de la RNAP, y un dominio carboxilo-terminal que presenta un motivo hélice-vuelta-hélice de unión a DNA (Drummond y col., 1990; Tropel y van der Meer, 2004) (Figura 4). El dominio central es el que muestra una mayor conservación entre los distintos activadores y pertenece a la superfamilia AAA+ de ATPasas, que es una amplia familia de ATPasas asociadas a la formación y remodelación de complejos de proteínas y ácidos nucleicos

(Studholme y Dixon, 2003). Este dominio se puede subdividir en dos zonas funcionales: una implicada en la unión e hidrólisis de ATP y otra que contiene el motivo altamente conservado GAFTGA y que está implicada en la interacción entre el activador y el factor σ^N de la RNA polimerasa (Tropel y van der Meer, 2004). Este tipo de activadores se presentan como homodímeros en solución y, en algunos casos este dominio está también implicado en la dimerización de la proteína (Klose y col., 1994) (Pelton y col., 1999)

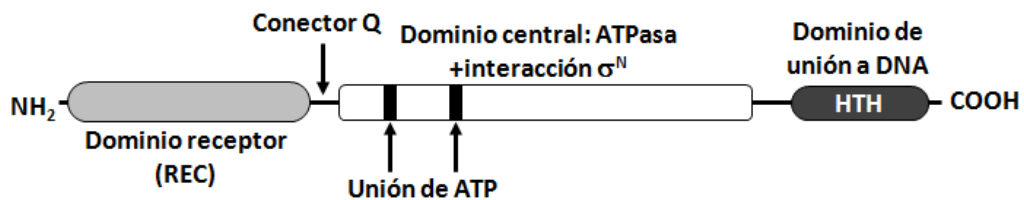


Figura 4. Arquitectura de dominios en EBP. Se representan los dominios típicos de EBP bacterianas, con un dominio receptor de la señal (REC) en el extremo N-terminal (NH₂), un dominio central de interacción con σ^N y con motivos de unión a ATP que catalizan la hidrólisis de ATP, y un dominio C-terminal (COOH) de unión a DNA, HTH (hélice-vuelta-hélice).

Como se ha mencionado anteriormente, el dominio amino terminal en los EBP es el mas variable. Existe un subgrupo de EBP que se activan mediante la fosforilación de un residuo de aspártico conservado en el dominio REC, como es el caso de NtrC o DctD (Studholme y Dixon, 2003). Estos reguladores pertenecen a sistemas de dos componentes y la fosforilación está catalizada por la proteína sensora HK, y se describirán con mayor detalle en el apartado siguiente.

1.1.3.3. Los reguladores de respuesta de promotores σ^N pertenecientes a sistemas de dos componentes

Los elementos reguladores de respuesta de los TCS que activan la transcripción de promotores dependientes del factor σ^N son activados mediante la fosforilación por parte de la HK de un residuo de Asp conservado en el dominio Nt. En este apartado se muestran algunos ejemplos de regulación ejercida por TCS sobre promotores de tipo σ^N en bacterias en general y en *P. putida* en particular.

El TCS NtrBC es el paradigma de este tipo de reguladores y se activa en condiciones de limitación de nitrógeno, a través de una cascada de señalización relativamente compleja. La cascada de señalización comienza con la detección de glutamina, que es el compuesto usado como indicador de las condiciones de limitación de nitrógeno, por parte de las proteínas PII (GlnK y GlnB en *Enterobacterias*, GlnK en *Pseudomonas*). Las proteínas PII se uridililan mediante la actividad uridilil transferasa de la enzima UTasa/UR en respuesta a niveles bajos de glutamina, mientras que una alta

concentración estimula la actividad liasa de la UTasa/UR, favoreciendo la desuridilación de PII. La proteína PII uridilada (PII-UMP) no interacciona con el sensor de tipo histidina quinasa NtrB, que se autofosforila y fosforila al regulador NtrC, activándolo. El proceso contrario ocurre cuando la proteína PII no está uridilada, en condiciones de alta disponibilidad de nitrógeno. La fosforilación de NtrC, que es un activador transcripcional de genes dependientes de σ^N , implica la activación directa de una serie de genes relacionados con el transporte y metabolismo de fuentes nitrogenadas (Reitzer y Schneider, 2001; Reitzer, 2003).

Otro ejemplo de este tipo de reguladores pertenece al TCS FlgSR de *Campylobacter jejuni*, que controla la producción del flagelo y movilidad. FlgSR, cuya expresión es dependiente de σ^{70} , dirige la expresión de los componentes del flagelo FlhD y FlhB, y también la del factor anti- σ FlgM, dentro de una compleja red reguladora en la que también está implicado el factor alternativo σ^{28} FlhA (Wosten y col., 2004). En las estirpes de *P. aeruginosa* PAK y PAO1, sin embargo, el sistema FlgSR requiere para activar su propia expresión el regulador transcripcional FleQ y el factor σ^N . FlgR a su vez, se encarga de activar otros promotores dependientes de σ^N cuyos productos están involucrados en la producción de distintos componentes del flagelo, como el cilindro del cuerpo basal, el anillo L, el gancho y las proteínas que lo unen al filamento. Así se establece una jerarquía con una fina regulación de la biogénesis de flagelo con cuatro niveles en los que se van sintetizando y ensamblando los distintos componentes del flagelo de forma ordenada y coordinada (Dasgupta y col., 2003).

Otro ejemplo bien caracterizado es el TCS DctBD, que controla el transporte de C4-dicarboxilatos en *Rizhobium meliloti* y *Rizhobium leguminosarum*. En este caso DctD activa la expresión del transportador de C4-dicarboxilatos DctA, codificado por *dctA*. La expresión de *dctB* que codifica la proteína sensora de membrana DctB, se activa en presencia de C4-dicarboxilatos y DctB activa al regulador citoplasmático DctD mediante fosforilación (Ronson y col., 1984; Ledebur y col., 1990). En *P. aeruginosa* se han identificado dos tipos de transportadores de C4-dicarboxilatos que responden al TCS DctBD. Uno de es un transportador de alta afinidad (DctA) que responde a concentraciones bajas de succinato, y el segundo es un transportador de baja afinidad (DctPQM), que se activa a altas concentraciones de sustrato (Valentini y col., 2011).

Por otra parte, se ha aprovechado el potencial de algunos reguladores de este tipo en procesos de interés industrial, como la producción de lipasas. El TCS LipQR de *Pseudomonas alcaligenes* M-1 se activa sólo en presencia de determinados aceites naturales como el de soja y algunos ácidos grasos insaturados como el ácido oleico. La proteína reguladora LipR activa la expresión del gen de la lipasa dependiente de σ^N , *lipA* (Cox y col., 2001; Krzeslak y col., 2008; Krzeslak

y col., 2012).. Además, LipQ y LipR presentan una identidad del 79 y 87% con las proteínas CbrA y CbrB de *P. aeruginosa*, cuyos ortólogos en *P. putida* son objeto de estudio en esta tesis.

El análisis *in silico* del genoma de *P. putida* reveló la existencia de 22 proteínas con dominio de interacción con σ^N , de las cuales 9 contienen el dominio regulador de respuesta que recibe la fosforilación por parte del elemento sensor de tipo histidina quinasa (Cases y col., 2003). Sin embargo, en *P. putida* sólo han sido caracterizados hasta la fecha dos TCS que regulan promotores dependientes de σ^N : AauRS y NtrBC. El primero controla el transporte y metabolismo de aminoácidos ácidos como aspártico, asparragina, glutamato y glutamina llamado AauRS, donde AauR es el regulador de respuesta y AauS la sensora quinasa (Sonawane y col., 2006). Los autores postulan que el sistema AauRS es el principal regulador del transporte/utilización de aminoácidos de carácter ácido.

Por otra parte, el papel regulador del sistema NtrBC en *P. putida* ha sido caracterizado en detalle en nuestro laboratorio, llegando a una caracterización del mecanismo molecular que dirige la activación de promotores dependientes de σ^N (Hervas y col., 2008; Hervas y col., 2009), pero también el mecanismo represor de promotores dependientes de σ^{70} , como el gen de la glutamato deshidrogenasa *gdhA*, en respuesta a unas condiciones de exceso de nitrógeno (Hervas y col., 2008; Hervas y col., 2009; Hervas y col., 2010). Gracias a este estudio se pudieron establecer analogías pero también diferencias en la regulación que ejerce este sistema de dos componentes en *Enterobacterias* y en *Pseudomonas*. Si bien el sistema responde a una señal de limitación de nitrógeno en ambos grupos bacterianos, la cascada de regulación que se desencadena difiere en algunos pasos. Según lo descrito, en enterobacterias la activación por NtrC en respuesta a limitación de nitrógeno actúa de forma directa sobre promotores σ^N e indirecta a través del activador transcripcional Nac (cuya expresión es dependiente de σ^N) sobre promotores dependientes de σ^{70} , actuando éste como adaptador (Reitzer y Schneider, 2001; Reitzer, 2003). Sin embargo, no sólo no se han encontrado ortólogos del adaptador Nac en *P. putida* sino que parece que los genes activados por Nac en enterobacterias están sujetos al control directo de NtrC sobre promotores σ^N (Hervas y col., 2009). Además, uno de los pocos genes inducidos en respuesta a exceso de nitrógeno, *gdhA*, es reprimido por Nac en enterobacterias mientras que NtrC reprime su expresión de forma directa en *P. putida* (Hervas y col., 2010). Por otra parte, mientras en enterobacterias existen dos proteínas PII, una que es expresada de forma constitutiva y otra en respuesta a limitación de nitrógeno, en *P. putida* sólo existe una proteína PII (GlnK), que determina el estado de fosforilación de NtrB, y su expresión es activada por NtrC en respuesta a las condiciones de limitación de nitrógeno. Así, NtrC se define como un regulador de promotores de tipo σ^N que responde a la disponibilidad de nitrógeno en *P. putida* de forma directa, sin necesidad de un adaptador como Nac.

1.2. Metabolismo del carbono en *P. putida*

El metabolismo de los azúcares en el género *Pseudomonas* tiene unas características específicas del grupo. A diferencia de otros organismos, la mayoría de las estirpes del género *Pseudomonas* (salvo *P. stutzeri*) carecen de la enzima fosfofructoquinasa, que transforma la fructosa-6-P en fructosa-1,6-biP, de modo que no pueden completar una glucólisis típica. Sí poseen sin embargo genes que codifican la fructosa-1,6-bifosfatasa y glucosa-6-P-isomerasa, esenciales para los pasos iniciales de la gluconeogénesis así como para la biosíntesis de exopolisacáridos. Al igual que *P. aeruginosa* PAO1, *P. putida* carece de los genes para la aldosa-1-epimerasa y glucosa-1-fosfatasa (Dos Santos y col., 2004). Así, la glucosa es convertida en gliceraldehído-3-P y piruvato a través de la ruta de Entner-Doudoroff (Figura 5), donde el 6-P-gluconato es un intermediario crucial. En el caso de *P. putida*, se ha demostrado que el catabolismo de glucosa a través de gluconato implica tres rutas iniciales que convergen en 6-P-gluconato: glucoquinasa, que conlleva la fosforilación de glucosa a glucosa-6-P, gluconoquinasa, que supone la fosforilación directa de gluconato a 6-P-gluconato y el ciclo del 2-oxogluconato, que conlleva la oxidación de gluconato a 2-oxogluconato y sus transformaciones posteriores. Las conversiones directas de glucosa a gluconato y de gluconato a 2-oxogluconato tienen lugar en el periplasma, mientras que las conversiones que conllevan fosforilación ocurren en el citoplasma. Los genes involucrados en estas tres rutas incluyen sistemas de transporte para glucosa, gluconato y 2-oxogluconato así como enzimas para su metabolismo. En definitiva, se trata de un conjunto de transformaciones de oxidación, reducción y fosforilación que convergen en 6-P-gluconato, que es metabolizado por las enzimas Edd y Eda de la ruta Entner-Doudoroff hasta los metabolitos centrales gliceraldehído-3-P y piruvato (Figura 3). El catabolismo de glucosa en *P. putida* se induce en presencia de glucosa y se encuentra regulado a nivel transcripcional por los represores HexR, GnuR y PtxS y el activador GntR-2 (del Castillo y col., 2007; del Castillo y col., 2008).

Además de las rutas para la asimilación de glucosa u otras hexosas, *P. putida* también posee todas las enzimas de la ruta de las pentosas-fosfato, del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, del ciclo del glioxilato (figura 5) y la cadena de transporte oxidativo de electrones. Adicionalmente, el análisis de su genoma sugiere que el carbono y la energía pueden derivar del metabolismo de un amplio rango de compuestos como acetoina, fructosa, butirato, betaina, glucosa, gluconato, glutarato, glicerol, malato, lactato, manosa, sacarosa, etc (Dos Santos y col., 2004).

En la figura 5 se esquematiza el metabolismo de compuestos carbonados en *P. putida* como aminoácidos, intermediarios del ciclo de Krebs y la glucosa y otros azúcares. *P. putida* se presenta como un microorganismo con numerosas rutas catabólicas para asimilar compuestos susceptibles de ser empleados como fuentes de carbono que necesitan ser coordinadas y organizadas para optimizar el metabolismo de la célula en función de la disponibilidad de carbono.

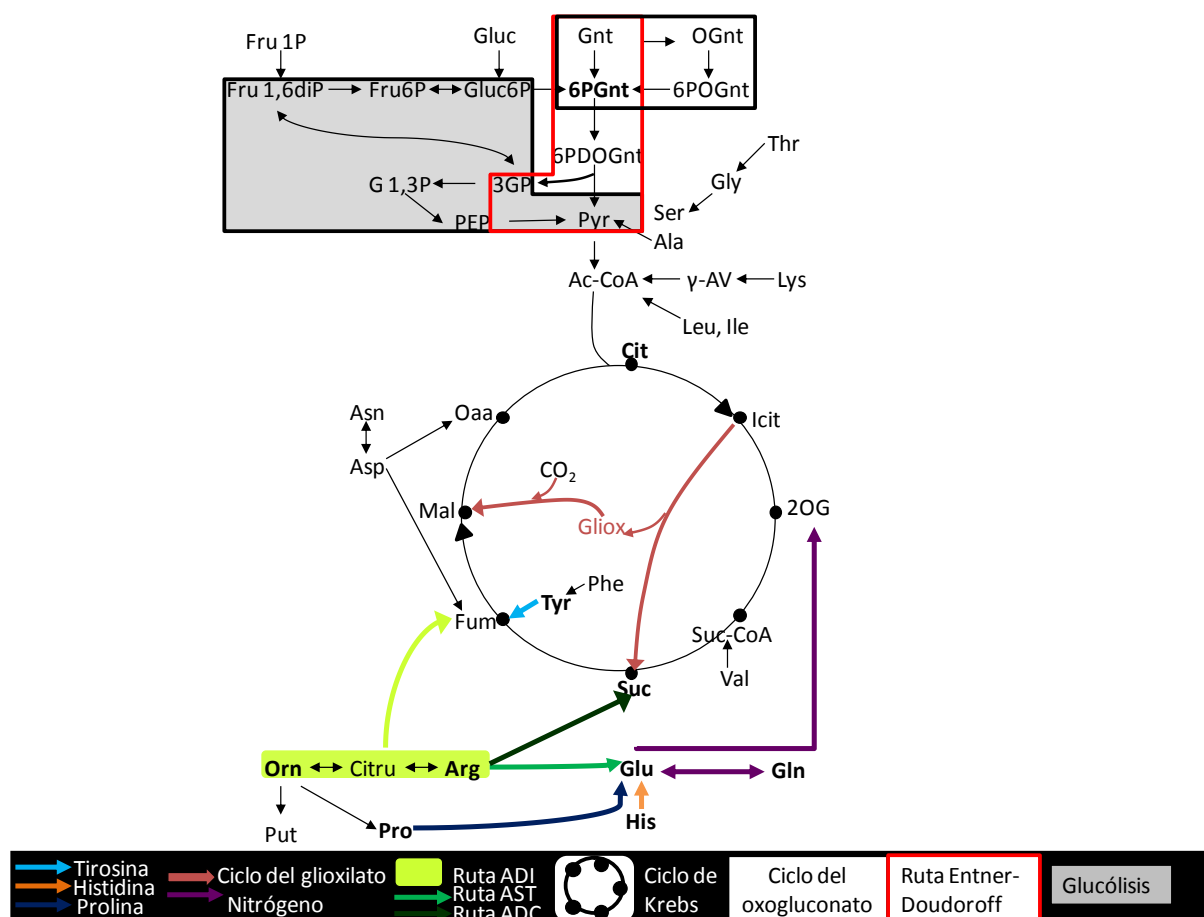


Figura 5. Metabolismo del carbono en *P. putida*. Se representan las principales rutas de utilización de aminoácidos existentes en *P. putida*, así como los ciclos de Krebs y del glioxilato. Además se esquematiza el catabolismo de glucosa en *P. putida*, que integra una glucólisis incompleta, la ruta de Entner-Doudoroff y la ruta de las pentosas-fosfato (no representada), que rinde pentosas a partir de hexosas. Se detallan las abreviaturas usadas en la figura: Fru 1P, fructosa 1-fosfato; Fru 1,6diP, fructosa 1,6-di-fosfato; Fru6P, fructosa 6-fosfato; Gluc, glucosa; Gluc6P, glucosa 6-fosfato; Gln, gluconato; 6PGnt, 6-fosfo-gluconato; OGnt, 2-oxogluconato; 6POGnt, 6-fosfo-2-oxogluconato; 6PDOGnt, 6-fosfo-3-deoxi-2-oxogluconato; Pyr, piruvato; 3GP, gliceraldehído 3-fosfato; G1,3P, ; **Aminoácidos.** Thr, treonina; Gly, glicina; Ser, serina; Ala, alanina; Lys, lisina; Leu, leucina; Ile, isoleucina; Asn, asparragina; Asp, aspartato; Orn, ornitina; Citru, citrulina; Arg, arginina; Pro, prolina; Glu, glutamato; Gln, glutamina; His, histidina; Phe, fenilalanina; Tyr, tirosina. **Ciclo de Krebs.** Cit, citrato; Icit, isocitrato, 2-OG, 2-oxoglutarato; Suc-CoA, succinil-CoA; Suc, succinato; Fum, fumarato; Mal, malato; Oaa, oxalacetato. Ac-CoA, acetil-coA. γ -AV, ácido γ -aminovalérico. Gliox, glioxilato. Put, putrescina.

1.2.1. La regulación global del carbono por la proteína Crc

Las condiciones ambientales en las que se encuentra habitualmente *P. putida* suelen contener una disponibilidad de fuentes de carbono limitada, aunque muy variada gracias, entre otros, a los exudados de las plantas: aminoácidos, azúcares, compuestos aromáticos, ácidos orgánicos, etc (Lugtenberg y Bloemberg, 2004). Por ello, la bacteria puede encontrarse simultáneamente con diversos compuestos susceptibles de ser utilizados como fuente de carbono. Al contrario que en enterobacterias, los azúcares no son la fuente de carbono preferida para las bacterias del género *Pseudomonas*, y utilizan de forma más eficiente otros compuestos como aminoácidos o ácidos orgánicos. Sin embargo, no todos los aminoácidos son buenas fuentes de carbono y existen ciertas preferencias en la asimilación de los mismos. En *P. putida*, la jerarquía en la asimilación de aminoácidos la establece la proteína Crc, mediante el denominado proceso de represión catabólica (RC). Crc es un represor traduccional que actúa uniéndose a algunos mRNAs diana. En *P. putida*, Crc favorece las rutas de asimilación y/o transporte de los aminoácidos prolina, alanina, glutamato, glutamina e histidina, considerados buenas fuentes de carbono. Por el contrario, inhibe la expresión de genes necesarios para la asimilación de valina, isoleucina, leucina, tirosina, fenilalanina, treonina, glicina y serina. En un mutante *crc*, la expresión de distintas porinas y transportadores de aminoácidos o dipéptidos también se encuentra alterada (Moreno y col., 2009b). Aunque las rutas de transporte y asimilación de aminoácidos se encuentren inducidas por la presencia del inductor específico, Crc puede bloquear la asimilación de esos compuestos mediante represión traduccional

Además de actuar sobre rutas catabólicas y transporte de aminoácidos, Crc también participa en la asimilación de azúcares como la glucosa, mediante represión de la porina OprB1 o los transportadores de membrana interna de glucosa y fructosa. También inhibe la asimilación de 6-P-gluconato a través de la ruta Entner-Doudoroff (Moreno y col., 2009b).

1.3. El sistema de dos componentes CbrAB

El TCS CbrAB es un sistema exclusivo de las pseudomonas y no se han identificado ortólogos en otras familias. Dado que esta familia de γ -proteobacterias se caracterizan por su versatilidad y capacidad de adaptación, es posible que este sistema les aporte alguna ventaja adaptativa, que no contienen otras familias bacterianas. El TCS CbrAB fue descrito por primera vez en *P. aeruginosa* PAO1, como elemento implicado en la utilización de varios aminoácidos (como arginina, histidina y prolina), algunas poliaminas (espermidina, putrescina) y la agmatina como fuente de carbono y

nitrógeno (Nishijyo y col., 2001). El análisis *in silico* de los productos CbrA y CbrB reveló que el sistema estaba compuesto por una proteína sensora de tipo histidina-quinasa CbrA, con 13 posibles dominios transmembrana en el extremo Nt, y que presentaba homología con las proteínas histidina-quinasa de la familia NtrB en el extremo Ct. Por otra parte, CbrB constituía el elemento regulador de respuesta con homología con los reguladores de la familia NtrC, con un dominio central de interacción con el factor alternativo σ^N . Inicialmente, el sistema CbrAB se presentó como el primer sistema de dos componentes que controlaba varias rutas específicas y modulaba el catabolismo de distintos sustratos en respuesta a diferentes proporciones de carbono-nitrógeno (C-N) (Nishijyo y col., 2001). Algunos fenotipos mostrados por el mutante *cbrB* coincidían con aquéllos observados en un mutante *rpoN*, entre ellos, un defecto en la utilización de distintas fuentes de carbono, por lo que se sugirió que CbrB podría ser el elemento regulador de la expresión de las rutas catabólicas a través de genes dependientes del factor σ^N .

La regulación de la utilización de histidina y su regulación por CbrAB ha sido descrita y caracterizada en *P. aeruginosa* (Li y Lu, 2007) y *P. fluorescens* SBW25 (Zhang y Rainey, 2007, 2008). No fue posible detectar actividad histidasa (el producto de *hiuH*) en mutantes *cbrA* o *cbrB*, indicando que ambos son esenciales en la regulación de la expresión del operón *hiu* (*histidine utilization*), tanto en ausencia como en presencia de histidina (Nishijyo y col., 2001). En *P. fluorescens* SBW25 se determinó que la regulación del operón de utilización de histidina depende de si es utilizada como fuente de carbono o nitrógeno. En concreto, se postuló que cuando la histidina era la única fuente de carbono, el operón de utilización de histidina (*hut*) era activado por CbrB desde un promotor dependiente de σ^N , mientras que cuando se empleaba como fuente de nitrógeno el promotor era dependiente de σ^{70} y podía ser activado por CbrB o NtrC (Zhang y Rainey, 2008). Esta hipótesis se basa exclusivamente en el mapeo del inicio de transcripción del gen *hutU* cuando se empleaba histidina como fuente de nitrógeno, que localiza a una distancia adecuada de una secuencia parecida al consenso para promotores σ^{70} . Sin embargo, según lo descrito en la bibliografía, NtrC ejerce de activador transcripcional sobre promotores dependientes de σ^N , lo que sugeriría que la regulación de CbrB/NtrC sobre ese promotor podría ser indirecta. Li y Lu (2007), describieron alelos constitutivos de *ntrB* y *ntrC* en *P. aeruginosa* que suprimían el defecto de crecimiento de un doble mutante $\Delta cbrAB$ en distintos aminoácidos (arginina, histidina, ornitina y prolina), sugiriendo que algunas dianas podrían estar sujetas a control dual por CbrAB y NtrBC (Li y Lu, 2007).

Aunque es habitual que los genes que forman un TCS se encuentren agrupados formando un operón, los genes *cbrA* y *cbrB* en *P. aeruginosa* PAO1 son contiguos pero se expresan de forma independiente a partir de promotores distintos. Además, los niveles de expresión de los dos también es muy distinto, y mientras la expresión de *cbrA* es muy baja y constitutiva, *cbrB* posee niveles de

expresión más altos e inducibles según la fuente de carbono presente en el medio (Nishijyo y col., 2001; Zhang y Rainey, 2008).

Hasta la fecha, se han descrito numerosos compuestos cuya utilización es dependiente del regulador CbrB. Entre ellos encontramos aminoácidos, poliaminas como la putrescina, u otros compuestos como agmatina y manitol además de intermediarios del metabolismo central de carbono como citrato, glucosa o piruvato entre otros. Muchos de estos compuestos son susceptibles de ser utilizados como fuente de carbono y nitrógeno, por lo que la regulación del flujo de carbono y de nitrógeno podría estar coordinada en estos casos. Además, se ha descrito que en *P. aeruginosa* un mutante *cbrB* que se encontraba afectado en la utilización de prolina, veía recuperada su capacidad para utilizarla cuando se encontraba en el medio algún intermediario del ciclo de Krebs a baja concentración (1 mM) (Nishijyo y col., 2001). Este efecto supresor, sin embargo, se anulaba al añadir amonio al medio, señal que inactiva el sistema NtrBC. Estos datos llevaron a postular a Nishijyo y colaboradores (2001) un posible solapamiento en las funciones de los sistemas NtrBC y CbrAB que contribuía a adecuar el balance de C-N en la célula. Los datos de Li y Lu en cuanto a la acción coordinada de los sistemas Ntr y Cbr sobre los genes de asimilación de la histidina, corroboraron más tarde esta hipótesis. En definitiva, la hipótesis de partida es que el sistema CbrAB podría intervenir en el suministro de carbono en presencia de los sustratos adecuados, y además podría coordinarse para ello con el TCS NtrBC.

Además del control de la asimilación de diversas fuentes de carbono, se ha descrito recientemente que el TCS CbrAB podría tener un papel más amplio en el metabolismo del carbono, e interactuar con el sistema de RC mediado por Crc. Sonnleitner y colaboradores (2009) han descrito que CbrB activa la expresión del RNA pequeño (sRNA) *CrcZ* en *P. aeruginosa*, y que es dependiente del factor σ^N . Este sRNA de 370 pb contiene varios motivos denominados CA en su secuencia, que son reconocidos por la proteína Crc. La unión de Crc a los motivos CA del sRNA, impide que la proteína reguladora ejerza su acción represora sobre otros mRNAs diana, impidiendo la RC.

El gen *crcZ* se localiza aguas abajo de *cbrB* en el genoma de *P. aeruginosa*, y también en el resto de las *Pseudomonas* que tienen ortólogo, incluida *P. putida*. Los niveles de expresión de *crcZ* fueron más altos en condiciones libres de represión catabólica en comparación con las condiciones de represión, lo cual concuerda con una tasa de secuestro de Crc elevada (Sonnleitner y col., 2009; Abdou y col., 2011). Recientemente se ha descrito en *P. putida* otro sRNA de gran similitud en secuencia a *CrcZ*, denominado *CrcY*, que cumple un papel equivalente a *CrcZ*. *crcY* se localiza aguas abajo del gen *mvaB*, que codifica una hidroximetilglutaril-CoA liasa, cuya expresión también está activada por CbrB (Moreno y col., 2012).

La interrelación de los sistemas Cbr-Crc supone una regulación del metabolismo del carbono sujeta al control de varios sistemas de regulación global (Figura 6).

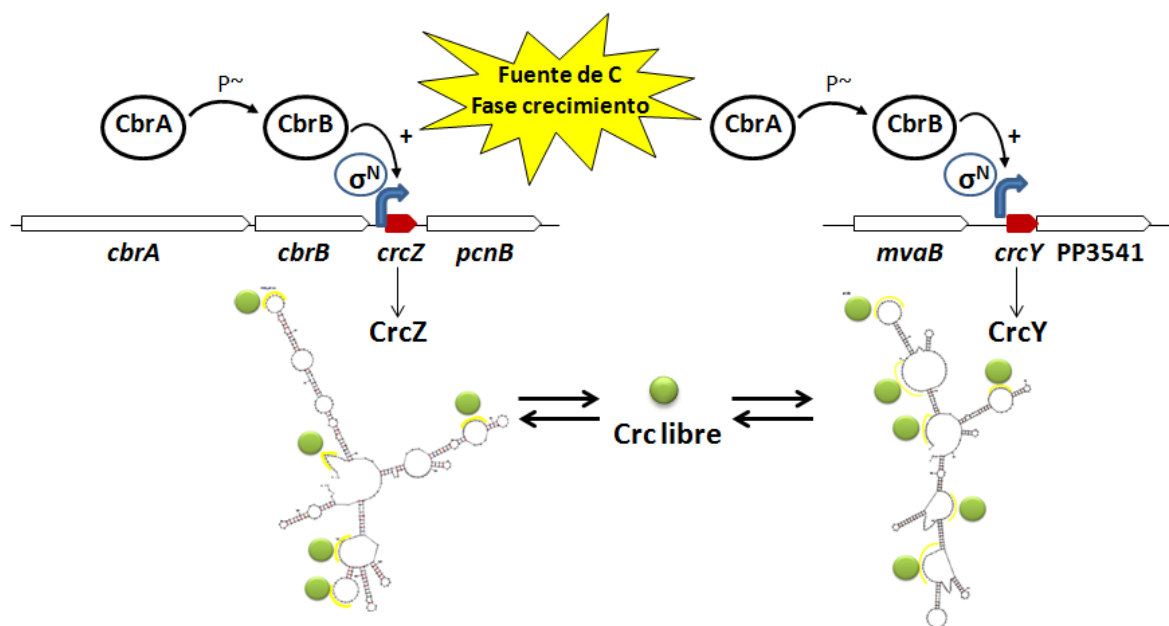


Figura 6. Activación de pequeños RNAs por CbrB en *P. putida*. Se muestra el circuito de regulación de los pequeños RNAs CrcZ y CrcY en el que CbrB funciona como activador. CbrA fosforila a CbrB tornando a su estado activado que, en concurso del factor σ^N unido a la RNAP, activa la transcripción de los pequeños RNAs. Crc es inactivada al reconocer los RNAs motivos CA de unión a RNA.

La exclusividad del TCS en unos pocos grupos de las γ -proteobacterias, que las diferencia de otras familias puede aportarles alguna ventaja evolutiva. El sistema Cbr podría compartir algunas dianas de regulación con Ntr, sin embargo esta función no había sido explorada hasta la fecha. La respuesta mediada por el sistema Ntr ha sido ampliamente caracterizada en nuestro laboratorio (Yuste y col., 2006; Hervas y col., 2008; Hervas y col., 2009; Hervas y col., 2010) y disponemos de la metodología y herramientas genéticas necesarias para ampliar el estudio y analizar la posible interacción con el sistema Cbr. Este panorama fue el inicio del trabajo desarrollado en esta Tesis Doctoral.

2. OBJETIVOS

1. Determinación de las condiciones de inducción del sistema regulador CbrAB
2. Análisis del patrón global de expresión controlado por el regulador de respuesta CbrB
3. Caracterización fenotípica causada por la mutación *cbrB*

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Estirpes, plásmidos, oligonucleótidos y condiciones de cultivo usados en esta tesis.

3.1.1. Estirpes utilizadas en esta tesis

Tabla 3

Estirpe	Genotipo/ Características relevantes	Referencia
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α	Φ80d <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> (<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (<i>r_k⁻ m_k⁺</i>)	(Hanahan, 1983)
<i>Pseudomonas putida</i>		
KT2442	mt-2 <i>hsdR1</i> (<i>r_k⁻ m⁺</i>); Rif ^r	(Franklin y col., 1981)
MPO201	mt-2 <i>hsdR1</i> (<i>r_k⁻ m⁺</i>) Δ <i>ntrC</i> ::Tc; Rif ^r Tc ^r	(Garcia-Gonzalez y col., 2005)
MPO400	mt-2 <i>hsdR1</i> (<i>r_k⁻ m⁺</i>) Δ <i>ntrC</i> ::Tc <i>cbrB</i> ::MiniTn5- <i>luxAB</i> -Km; Rif ^r Km ^r Tc ^r	(Amador y col., 2010)
MPO401	mt-2 <i>hsdR1</i> (<i>r_k⁻ m⁺</i>) Δ <i>cbrB</i> ::Km; Rif ^r Km ^r	Esta tesis
MPO406	mt-2 <i>hsdR1</i> (<i>r_k⁻ m⁺</i>) <i>cbrB</i> ::MiniTn5- <i>luxAB</i> -Km; Rif ^r Km ^r	J.L.Ramos, cedida
<i>fleQ</i>	mt-2 <i>hsdR1</i> (<i>r_k⁻ m⁺</i>) <i>fleQ</i> ::MiniTn5-Km ; Rif ^r Km ^r	Govantes y col., 2007 (sin publicar)
MPO425	mt-2 <i>hsdR1</i> (<i>r_k⁻ m⁺</i>) P _{A1/03/04} :: <i>gfp</i> mut3-T ₁ -T ₀ ::Tn7; Rif ^r Gm ^r / Contiene un cassette miniTn7-Gm ^r P _{A1/03/04} :: <i>gfp</i> mut3-T ₁ -T ₀ integrado en el sitio único att7 del cromosoma;	Esta tesis
MPO426	mt-2 <i>hsdR1</i> (<i>r_k⁻ m⁺</i>) P _{A1/03/04} :: <i>ecfp</i> -T ₁ -T ₀ ::Tn7 Rif ^r Sm ^r / Contiene un cassette miniTn7-Sm ^r P _{A1/03/04} :: <i>ecfp</i> -T ₁ -T ₀ integrado en el sitio único att7 del cromosoma;	Esta tesis
MPO427	mt-2 <i>hsdR1</i> (<i>r_k⁻ m⁺</i>); Rif ^r Sm ^r Gm ^r / Contiene un cassette miniTn7- Sm ^r P _{A1/03/04} :: <i>yfp</i> -T ₁ -T ₀ integrado en el sitio único att7 del cromosoma;	Esta tesis
MPO444	mt-2 <i>hsdR1</i> (<i>r_k⁻ m⁺</i>) Rif ^r Km ^r <i>cbrB</i> ::miniTn5- <i>luxAB</i> -Km / Contiene un	Esta tesis

	cassette miniTn7-Gm ^r P _{A1/03/04} :: <i>gfp</i> mut3-T ₁ -T ₀ integrado en el sitio único att7 del cromosoma; Rif ^r Km ^r Gm ^r		
MPO445	mt-2 <i>hsdR1</i> (r ⁻ m ⁺) Rif ^r Km ^r <i>cbrB</i> ::miniTn5- <i>luxAB</i> -Km/ Contiene con un cassette miniTn7-Gm ^r P _{A1/03/04} :: <i>ecfp</i> mut3-T ₁ -T ₀ integrado en el sitio único att7 del cromosoma; Rif ^r Km ^r Sm ^r	Esta tesis	
MPO446	mt-2 <i>hsdR1</i> (r ⁻ m ⁺) <i>cbrB</i> ::miniTn5- <i>luxAB</i> -Km con un cassette miniTn7-Gm ^r P _{A1/03/04} :: <i>yfp</i> mut3-T ₁ -T ₀ integrado en el sitio único att7 del cromosoma; Rif ^r Km ^r Sm ^r	Esta tesis	
MPO453	mt-2 <i>hsdR1</i> (r ⁻ m ⁺) con un cassette miniTn7-Gm ^r integrado en el sitio único att7 del cromosoma; Rif ^r Gm ^r	Isabel Martínez	Pérez- (sin publicar)
MPO456	mt-2 <i>hsdR1</i> (r ⁻ m ⁺) <i>PcrcZ-crcZ</i> ::Tc; Rif ^r Tc ^r	Esta tesis	
MPO458	mt-2 <i>hsdR1</i> (r ⁻ m ⁺) con un cassette miniTn7-Gm ^r <i>PbenA</i> :: <i>lacZ</i> integrado en el sitio único att7 del cromosoma; Rif ^r Gm ^r	Esta tesis	
MPO459	mt-2 <i>hsdR1</i> (r ⁻ m ⁺) <i>cbrB</i> ::miniTn5- <i>luxAB</i> -Km con un cassette miniTn7-Gm ^r <i>PbenA</i> :: <i>lacZ</i> integrado en el sitio único att7 del cromosoma; Rif ^r Km ^r Gm ^r	Esta tesis	
MPO460	mt-2 <i>hsdR1</i> (r ⁻ m ⁺) <i>cbrB</i> ::miniTn5- <i>luxAB</i> -Km con un cassette miniTn7-Gm ^r integrado en el sitio único att7 del cromosoma; Rif ^r Km ^r Gm ^r	Esta tesis	
MPO461	mt-2 <i>hsdR1</i> (r ⁻ m ⁺) Δ <i>cbrB</i> ::Km con un cassette miniTn7-Gm ^r <i>PbenA</i> :: <i>lacZ</i> integrado en el sitio único att7 del cromosoma; Rif ^r Km ^r Gm ^r	Esta tesis	
MPO462	mt-2 <i>hsdR1</i> (r ⁻ m ⁺) Δ <i>cbrB</i> ::Km con un cassette miniTn7-Gm ^r <i>PbenA</i> :: <i>lacZ</i> integrado en el sitio único att7 del cromosoma; Rif ^r Km ^r Gm ^r	Esta tesis	

Pseudomonas aeruginosa

PAO1	Silvestre	(Holloway, 1955)
------	-----------	------------------

3.1.2. Plásmidos utilizados en esta tesis

Tabla 4

Plásmido	Características relevantes	Referencia
pBBRMCS-4	Vector de amplio espectro. Tra ⁻ Mob ⁺ . Ap ^r /Cb ^r	(Kovach y col., 1995)
pBK-mini-Tn7-gfp2	Vector para integrar construcciones en cromosoma por el sistema Tn7. mini-Tn7-Gm ^r -P _{A1/04/03} - <i>egfp</i> Mob ⁺ . Gm ^r Ap ^r .	(Koch y col., 2001)
miniTn7 (Km,Sm) P _{A1/04/03} -ecfp-a	Vector para integrar construcciones en cromosoma por el sistema Tn7. mini-Tn7-Gm ^r -P _{A1/04/03} - <i>ecfp</i> . Mob ⁺ . Km ^r Sm ^r Cm ^r .	(Lambertsen y col., 2004)
miniTn7 (Km,Sm) P _{A1/04/03} -eyfp-a	Vector para integrar construcciones en cromosoma por el sistema Tn7. mini-Tn7-Gm ^r -P _{A1/04/03} - <i>eyfp</i> . Mob ⁺ . Km ^r Sm ^r Cm ^r .	(Lambertsen y col., 2004)
pEX18-Tc	Vector para realizar reemplazamiento genético en el cromosoma Mob ⁺ <i>sacB</i> ⁺ . Sac ^S Tc ^r	(Hoang y col., 1998)
pJB3-Km1	Vector de clonación de amplio espectro, IncP. Mob ⁺ . Ap ^r Km ^r	(Blatny y col., 1997)
pKNΔcrcZ-Tc	Derivado de pKNG-101 con un cassette de Tc interrumpiendo <i>crcZ</i> y su promotor. Para generar un mutante de delección <i>crcZ</i> . Sm ^r Tc ^r Sac ^S Tra ⁻ Mob ⁺ .	(Moreno y col., 2012)
pMPO215	Derivado de pKNG101, contiene las secuencias flanqueantes de <i>ntrC</i> y entre ellas el cassette de Tc, y <i>sacB</i> que otorga sensibilidad a sacarosa para la contraselección en un medio con sacarosa. Sm ^r Tc ^r Sac ^S Tra ⁻ Mob ⁺	(Garcia-Gonzalez y col., 2005)
pMPO1240	Derivado de pBBRMCS-4, con un fragmento que contiene P _{cbrB} + <i>cbrB</i> ₆₇₀ clonado en la diana <i>HindIII</i> para expresar CbrB ₆₇₀ desde su propio promotor y RBS.	Esta tesis
pMPO1241	Derivado de pBBRMCS-4, con un fragmento que contiene P _{cbrB} + <i>cbrB</i> ₄₅₃ clonado en la diana <i>HindIII</i> para expresar CbrB ₄₅₃ desde su propio promotor y RBS.	Esta tesis
pMPO1242	Derivado de pBBRMCS-4, con un fragmento que contiene P _{cbrB} + <i>cbrB</i> truncadolux clonado en la diana <i>HindIII</i> (romo) para expresar CbrB _{luxA} desde su propio promotor y RBS.	Esta tesis

pMPO1247	Derivado de pJB3-Km1 con <i>crcZ</i> bajo Ptac (espaciador 5 nt) clonado entre las dianas <i>Bam</i> HI- <i>Eco</i> RI.	Esta tesis	
pMPO1248	Derivado de pJB3-Km1 con <i>crcZ</i> bajo Ptac (espaciador 5 nt) clonado entre las dianas <i>Bam</i> HI- <i>Eco</i> RI.	Esta tesis	
pMPO1249	Derivado de pJB3-Km1 con <i>crcZ</i> bajo Ptac (espaciador 5 nt) clonado entre las dianas <i>Bam</i> HI- <i>Eco</i> RI.	Esta tesis	
pMPO1250	Derivado de pBBRMCS-4, con un fragmento que contiene <i>PcbrB+cbrB</i> silvestre clonado en la diana <i>Hind</i> III para expresar la proteína <i>CbrB</i> silvestre desde su propio promotor y RBS.	Esta tesis	
pMPO1256	Derivado de pEX18-Tc que contiene el fragmento <i>Hind</i> III de pMPO1250 con <i>PcbrB+cbrB</i> silvestre bajo su propio promotor para sustituir alélicamente en el cromosoma de <i>P. putida</i> KT2442 <i>cbrB:luxAB-Km</i>	Esta tesis	
pMPO1323	Derivado de pME6182 , vector de clonación de fragmentos para integrar en el cromosoma de <i>P. putida</i> por el sistema <i>Tn7</i> . Contiene una fusión transcripcional <i>benA-lacZ</i> . <i>Gm^r Ap^r</i>	Isabel Pérez-Martínez (sin publicar)	
pRK2013	Plásmido auxiliar en conjugaciones. Replicón <i>ColE1</i> . <i>Tra+</i> , <i>Kmr</i> .	(Figurski y Helinski, 1979)	
pUX-BF13	Plásmido auxiliar en transposición; proporciona las funciones de transposición del sistema <i>Tn7</i> en <i>trans</i> . <i>Mob⁺</i> . ori <i>R6K</i> . <i>Ap^r</i>	(Bao y col., 1991)	

3.1.3. Oligonucleótidos utilizados en esta tesis.

Tabla 5

Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'	Diana
cbr-1	TTCTGGGCGCTAGGCGGCTCGCTGACCTG	<i>cbrB</i>
cbr-2	GGAAGGCCGCTAGGCGCTGGGCATCCACG	<i>cbrB</i>
cbr-3	GCGGCCAACTAGTTGCTGTTTACC	<i>cbrA</i>
cbr-5	GAAGAGCTCACCAGCATCGCC	<i>cbrA</i>
cbr-6	CACCGACGCCGCATAGGCTGC	región promotora <i>crcZ</i>
cbrA 1Q	CAGGACATGGTCGAGACTTTCC	<i>cbrA</i>

cbrA 2Q	GTGGATGTCTTCGGTCACGTAGT	<i>cbrA</i>
cbrB 1Q	AGCAAGCCATTCGTCACTACAG	<i>cbrB</i>
cbrB 2Q	GTTTTCCAGTTCACGCACGTT	<i>cbrB</i>
cbrB CD rev	CCAAGCTTCAGCCGATCTCGCCATTGGC	<i>cbrB</i>
cbrB PEx	CGCTCAAGCAGGCGACGCAGGGCCGAGCTG	<i>cbrB</i>
cbrB truncado HindIII rev	CCAAGCTTCAGGCCGAACAGTTCGGATT	<i>cbrB</i>
cbrB truncado luxA rev	GGTATTACGATAAGACCTAAGCCA	<i>luxA (Vibrio harvey)</i>
cbrB23 1Q	AAGACGAAACCATCATCCGC	<i>cbrB</i>
cbrB3' HindIII rev2	GTTTAAGCTTATTCGCTGGTAGCGTTGC	<i>cbrB</i>
cbrB314	TGCTGCAGGCAGTAGCGCGT	<i>cbrB</i>
cbrB-477 1Q	GCAGGACATGTACAGCAAGATCC	<i>cbrB</i>
cbrB-529 1Q	GCACATTGGAGTCGGTAGGC	<i>cbrB</i>
cbrB74 2Q	TGGTTCCGCTCAAGCAGG	<i>cbrB</i>
cbrB944	ACGTGCAGTCGGTAATACAA	<i>cbrB</i>
cbrB-NdeI fwd	TGAACATATGCCGCACATTCTGATCGTC	<i>cbrB</i>
cbrBseq PEx fwd	CAGCGAGGTTAACGAGCACA	<i>cbrA</i>
crcY439-3Q	CAACACCAGGACAAGCCGA	<i>crcY</i>
crcY490-4Q	TTTATTATTGGGACCGGCCTATT	<i>crcY</i>
crcYPEx	TTGTTCTTGTTATGTCAGAGCCGTTACCTG	<i>crcY</i>
crcZ PEx	TTTTATTGTGCGTGAGCCGTTTCGTCTTGT	<i>crcZ</i>
crcZ49 1Q	AACGGCTCACGCACAATAAAA	<i>crcZ</i>
crcZ99 1Q	AATCAGTTAGCTGCGCCTCC	<i>crcZ</i>
crcZseq fwd	CCCACCTACGCACCGCACGC	Región promotora <i>crcZ</i>
FusioncrcYF	CCGAATTCCAGCGCACAAATAGG	<i>mvaB</i>
FusioncrcYRbisBam	CACGGATCCAGAGATATAGCAGGGT	<i>crcY</i>

hutU_1Q	ATCGAATGCCAGCAGAGCC	<i>hutU</i>
hutU_2Q	GACGTAGCGGGTTTCCAGG	<i>hutU</i>
I-long	CAGCATAACTGGACTGATTTTCAG	Extremo I miniTn5/ <i>luxAB</i> Km
L28-1	CCCACGCAAACAACAAAACC	<i>rpmB</i>
L28-2	TCGGATTCAACCCAGAAAACG	<i>rpmB</i>
lapF_1Q	GCAATCCGAAGTCGCCACT	<i>lapF</i>
lapF_2Q	GCGTTTAGATTGATATTGCCCC	<i>lapF</i>
luxA_273	TACGTCTTCTGCTTGTCGAA	<i>luxA</i> (<i>Vibrio harvey</i>)
nuoA 1Q	AGGACTCATCGCCCACT	<i>nuoA</i>
nuoA 2Q	GACGACACCCAGGAGGAAGAT	<i>nuoA</i>
O-long	CAGCATAACTGGACTGATTTTCAG	Extremo O miniTn5/ <i>luxAB</i> Km
PcbrB HindIII fwd	CCAAAAGCTTGCCTGGCTGAAGTGGCA	<i>cbrA</i>
pcnB286 1Q	ATTGGTCGTCGCTTCAAATTG	<i>pcnB</i>
pcnB336 2Q	AATGATCTCACGGCCGAAAT	<i>pcnB</i>
PP3126 1Q	TTTCTGCATGCTGACGGTGT	PP3126
PP3126 2Q	CTGCTCTGGTCGGCGTTAC	PP3126
PP3128 1Q	ATGAGTATTGCCACACACACC	PP3128
PP3128 2Q	GTCGAAGTCCACCAGTAACGC	PP3128
PP3932 1Q	TGTGGTGTGCCTGGACCTATT	PP3932
PP3932 2Q	TGAGCGTCAGCAATGAAACC	PP3932
Ptac-crcZ1 BamHI F	AACCGGATCC TTGACA ATTAATCATCGGCTCG TATAA TG TGTGGTACAAGAACAATAACAAGCACTGC	
Ptac-crcZ2 BamHI F	AACCGGATCC TTGACA ATTAATCATCGGCTCG TATAA TG TGTGGATACAAGAACAATAACAAGCACTGC	
Ptac-crcZ3 BamHI F	AACCGGATCC TTGACA ATTAATCATCGGCTCG TATAA TG TGTGGAATACAAGAACAATAACAAGCACTGC	
Ptac-crcZ EcoRI R	AACCGAATTCGGATGCCTGCCAGAAGGGTAGAAA	

Tn7-GlmS	AATCTGGCCAAGTCGGTGAC	<i>glmS</i>
Tn7R109	CAGCATAACTGGACTGATTCAG	Extremo R Tn7
tyrB1_1Q	ACTTCCTCAAGCGCCTCTCG	<i>tyrB-1</i>
tyrB1_2Q	CTAGGGTCGCTGATGGCAAC	<i>tyrB-1</i>

3.1.4. Medios y condiciones de cultivo generales.

Las estirpes empleadas en este trabajo se cultivaron en medio Luria-Bertani (LB) cuya composición es 10 g/L de triptona, 5 g/L de extracto de levadura y 5 g/L de cloruro sódico (Sambrook, 2000). Cuando se requirió usar medio sólido se le añadió 15 g/L de agar bacteriológico (Panreac). Como medio mínimo definido se utilizó una variante adaptada para el cultivo de *Pseudomonas* sp. ADP (Mandelbaum y col., 1993) preparado a partir de las siguientes mezclas concentradas: tampón fosfato salino (para una solución 10 veces concentrada, 70 g/l de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 28 g/l de KH_2PO_4 y 5 g/l de NaCl), una solución de microelementos (para una solución 500 veces concentrada, 50 g/L de $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 5 g/L de $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 2,5 g/L de $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 3,2 g/L de ZnCl_2 , 0,33 g/L $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 0,18 g/L de $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$, 0,15 g/L de $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 3,25 g/L de H_3BO_3 , 5 g/L de EDTA y 73 mL de HCl al 37%; filtrados y conservados a temperatura ambiente) y vitaminas (para una solución 100 veces concentrada, 10 mg/L de tiamina-HCl, 4 mg/L de ácido fólico, 20 mg/L de nicotinamida y 20 mg/L de piridoxina-HCl; esterilizado por filtración y conservado a 4 °C). Como fuente de carbono para *P. putida* se utilizó succinato sódico 20 mM (preparado a 1M, autoclavado y conservado a temperatura ambiente) y como fuente rica de nitrógeno, se utilizó cloruro de amonio 20 mM (preparado a 2 M, autoclavado y conservado a temperatura ambiente). Los aminoácidos analizados como fuentes de carbono y nitrógeno para *P. putida* fueron prolina, ornitina, tirosina, arginina, histidina y glutamato, y se utilizaron en el medio de cultivo a una concentración de 20 mM excepto la tirosina que se usó a 5 mM a causa de su baja solubilidad. Los stocks se prepararon a 2 M para prolina, ornitina y tirosina y 1 M para los tres últimos. El citrato se usó como fuente de carbono a 10 mM en el medio mínimo y se preparó un stock de citrato sódico a 1 M. Los compuestos empleados como suplemento del crecimiento (malato, succinato o α -cetoglutarato), se usaron a concentración de 1 mM en el medio de cultivo.

Las búsqueda de condiciones en las que se detectase una mayor diferencia en el crecimiento entre una estirpe silvestre y el mutante *cbrB* MPO406, se realizaron en los siguientes medios: LB diluido 4, 8 y 12 veces en agua con tampón fosfato salino; en medio mínimo con casaminoácidos 3

g/L (20 mM), 1,5 g/L (10 mM), 0,75 g/L (5 mM), 0,375 g/L (2,5 mM) y 0,15 g/L (1 mM) como fuente de carbono y nitrógeno (usando el promedio de masa molecular 150 g/mol por aminoácido); y en medio mínimo con L-aminoácidos (0,6 mM cada uno), que incluían los 20 aminoácidos más la ornitina.

El crecimiento de cultivos de *P. putida* se llevó a cabo a una temperatura de 30 °C y 180 rpm. Cuando fue necesario, y para asegurar la selección y mantenimiento de plásmidos y marcadores cromosómicos, se añadieron los siguientes antibióticos: ampicilina a 100 mg/L (solo se empleó para *E. coli*), carbenicilina a 500 mg/L (sólo se empleó para *P. putida*), kanamicina a 25 mg/L, tetraciclina a 5 mg/L (para *E.coli*) y 15 mg/L (*P. putida*), rifampicina a 20 mg/L, cloramfenicol a 15 mg/L, gentamicina a 10 mg/L. Para detectar actividad β -galactosidasa en medio sólido se empleó X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-b-D-galactopiranosido) a una concentración final de 25 mg/L.

3.1.5. Condiciones de cultivo específicos

3.1.5.1. Cultivo de biofilms en cámaras de flujo continuo de nutrientes

Los ensayos de biofilms fueron realizados a 25 °C en sistemas de cámaras de flujo con flujo continuo de nutrientes. El sistema de flujo comprende típicamente los siguientes componentes (figura):

- Medio de cultivo: un matraz o bote de 5 L de capacidad destinado al medio de cultivo que alimenta al sistema. Está indicado como 1 en la figura 1. De este bote sale tubo de silicona denominado como 2 en figura 1. Este bote siempre está estéril.
- Bomba. Bomba del sistema (*Watson-Marlow 205S*, Watson-Marlow) para 16 canales, indicado como 6 en la figura 1. Hace funcionar el flujo desde el medio de cultivo hasta el matraz de residuos, pasando por las cámaras.
- Trampa de burbujas. Consiste en un cilindro vertical (jeringa) montado sobre la línea del medio. Cualquier burbuja que pasa a través de la trampa acaba flotando en el cilindro y así se previene su paso aguas abajo de la trampa (hacia la cámara). Se indica como 4 en la figura 1.
- Cámara de flujo. Es el sustrato en el que se forma y monitoriza el biofilm. Se trata de una lámina de policarbonato de 6mm de grosor donde se han tallado 3 canales de 1 mm de profundidad, 4 mm de ancho 40 mm de longitud (figura 2). A través de ellos pasará el medio al flujo que seleccionemos. Permanece estéril hasta el momento de inoculación y se indica en la figura 1 como 5.
- Reservorio de efluente. Es el matraz/bote donde va a ir el residuo, es decir, el efluente de la cámara de flujo con bacterias que no se adhieran a la superficie del cubre montado sobre la

cámara de flujo. No va a estar estéril nunca salvo antes de empezar a funcionar el sistema. Se muestran como 7 en la figura 1.

- Tubos. Tubos conectores del sistema. Son el “recipiente” a través del cual el medio va a ser conducido desde el matraz de medio, pasando por la bomba, más tarde por las trampas de burbujas, llenando la cámara de flujo de nutrientes para las bacterias y acabando finalmente en el residuo. Se pasan a describir los distintos tipos de tubos a utilizar:
 - Silicona, 4 mm de diámetro externo, 2 mm de diámetro interno (pared de 2 mm), indicado como 2 en la figura 1. Se usan en los extremos del sistema, es decir, antes de entrar a la bomba y tras las cámaras hacia el matraz de efluente.
 - Silicona, 3 mm de diámetro externo (OD), 1 mm de diámetro interno (ID; pared de 2 mm), indicado como 3 en figura 1. Se usan a la entrada y salida de la bomba, hacia las trampas de burbujas y para entrar y salir a la cámara de flujo.
 - Marprene, 3 mm de diámetro externo y 1 mm de diámetro interno, indicado como 6 en la figura 1. Sólo se usan para que el medio fluya a través de la bomba ya que son más resistentes debido al rozamiento en ésta.
- Conectores. Adaptadores de tubos. Se utilizan en el sistema bien para bifurcar el flujo en 2 tubos, bien para adaptar de un tubo de OD4 a otro de OD3 (o viceversa), o de tubos de silicona a tubos de Marprene. Todos son de polipropileno no coloreado de la compañía Cole-Parmer. Se detallan a continuación los tipos de conectores utilizados en el sistema:
 - Conectores en T 1/16”x1x16”, indicados como 3 en figura 1. Para hacer bifurcaciones del flujo antes de la bomba.
 - Conectores 1/8”x1/8”, indicado como 1 en figura 1. Para conectar tubos de OD4, a la salida de la botella de medio.
 - Conectores 1/16”x1/16”, indicados como 3 en figura 1. Para conectar tubos de OD3, tras la bomba.
 - Conectores 1/8”x1/16”, indicados como 9 en Figura 1. Para conectar de tubos de OD4 con otros de OD3 o viceversa.

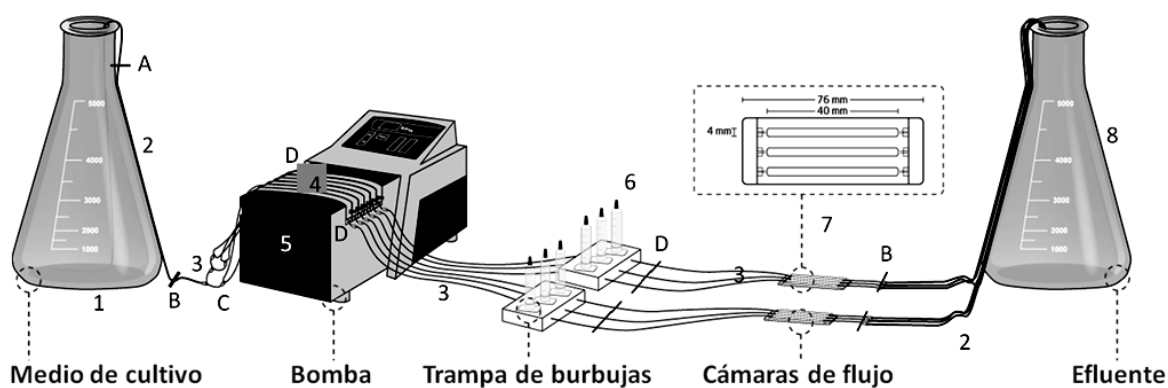


Figura 7. Esquema de un sistema de cámaras de flujo. Se presenta un sistema de flujo ensamblado y sus componentes: medio de cultivo (1), bomba peristáltica (5) de 16 canales, trampa de burbujas (6), cámara de flujo (7) y reservorio de efluente (8). Todos estos componentes están conectados por conectores y un sistema de tubos de distinta composición y grosor. **Conectores.** A: 1/8"x1/8"; B: 1/8"x1/16"; C: T' 1/16"x1/16"; D: 1/16"x1/16". **Tubos.** 2: silicona, diámetro interno 2 mm y externo 4 mm; 3: silicona, diámetro interno 1 mm y externo 3 mm. 4: maripeno, diámetro interno 1 mm y externo 3 mm;

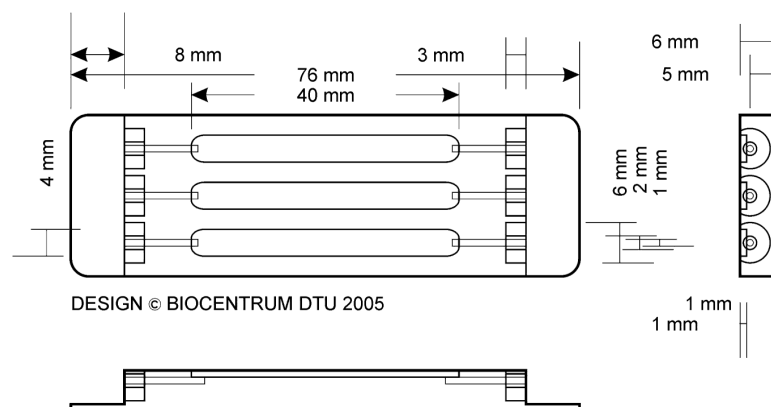


Figura 8. Esquema de una cámara de flujo. Cada cámara de flujo se compone de 3 canales con un tamaño de 40 mm de longitud, 4 mm de ancho y 1 mm de profundidad (z). Cada canal tiene su entrada y salida para conectar con el sistema de tubos (figura 1). Diseño y figura por Biocentrum DTU, Dinamarca (2005).

El sistema de flujo para análisis de formación de biofilm fue preparado y ensamblado según lo descrito previamente. Cada experimento se llevó a cabo partiendo de stocks de células recién descongeladas previamente a cada inoculación. Para la preparación de los inóculos se pusieron cultivos, a partir de una única colonia conteniendo medio LB y se crecieron a 30 °C con agitación constante (220 rpm) durante 16 h. Los cultivos saturados fueron diluidos 1000 veces por dilución seriada en 0,9% NaCl y 250 µl de esta suspensión fueron inyectados con una jeringa de insulina (Terumo) en el extremo inicial del canal de la cámara de flujo. A continuación, se incubó el sistema durante 1 hora sin flujo y con las cámaras hacia abajo para permitir la adhesión de las bacterias al sustrato (cubreobjetos) y posteriormente se inició el flujo constante a 1,75 rpm utilizando una bomba peristáltica multicanal. En todos los casos el medio utilizado fue LB diluido 50 veces en agua milliQ.

Para el análisis de la estructura y evolución de los biofilms de *P. putida silvestre* y mutante MPO406, las cepas fueron marcadas con la proteína GFP mediante la transformación con el plásmido pMPO1226 que se integraría aguas abajo del gen *glnS* en el cromosoma.

Para el estudio de competencia se marcaron ambas cepas diferencialmente tanto con la proteína fluorescente amarilla YFP como con la proteína fluorescente azul CFP, mediante la integración en el cromosoma de los plásmidos pMPO1227 y pMPO1228 y se compararon de forma cruzada: silvestre Yfp (MPO427) vs. MPO406 Cfp (MPO445) y silvestre Cfp (MPO426) vs. MPO406 Yfp (MPO446) para descartar la variabilidad asociada a un tipo de marcaje. En este caso se inocularon los canales con ambas estirpes en proporción silvestre:mutante 1:1, 9:1 o se inoculó la estirpe mutante con 24 horas de retraso respecto al silvestre. Además de monitorizar a distintos tiempos, se hicieron ensayos de *time lapse* donde se mantenía fijo el campo analizado y se tomaban grupos de imágenes cada 15 minutos en la ventana temporal de 12 a 24 horas desde la inoculación. El montaje de las imágenes en continuo permitió la obtención de películas y la visualización de los procesos a tiempo real e *in vivo*.

Todos los ensayos de análisis de formación de biofilms se realizaron al menos por triplicado. En cada uno, la estirpe a analizar se cultivó en tres canales separados, y en cada canal se adquirieron, al menos, tres grupos de imágenes en cada punto de tiempo analizado (15, 24, 48, 96 y 144 h).

Para el estudio del efecto del SDS sobre la formación/dispersión de los biofilms en la estirpe silvestre y mutante MPO406 se usaron las estirpes marcadas con GFP y se prepararon distintos reservorios de medio que alimentaban a los distintos canales. Uno de los reservorios alimentaba a los canales que servían de control, que contenían medio LB 1/50. A los otros dos se le añadió SDS a concentraciones de 0,01 % y 0,1 %, al cabo de 24 h (biofilm temprano) o de las 96 horas (biofilm maduro) desde la inoculación. Junto con el SDS se le añadió yoduro de propidio 1:2000 (0,5 µg/ml concentración final, InvitrogenTM) que penetra en las células que han sufrido una polarización de las membranas y tiñe las células muertas. Se visualizaron las cámaras transcurridas 3 horas después de la adición de SDS para asegurar que los compuestos habían alcanzado las cámaras y provocado su efecto sobre los biofilms. Se visualizaron las cámaras de nuevo transcurridas 24 h para observar el efecto a largo plazo. Los experimentos con biofilms tempranos o tardíos se hicieron en experimentos independientes.

Para analizar el efecto de la adición de antibióticos sobre la integridad de los biofilms, se usaron las estirpes marcadas con GFP, y se usó colistina (sulfato, SIGMA), un péptido antimicrobiano del grupo de las polimixinas, a concentraciones de 0,5 y 1 mg/mL. Estas concentraciones son 10 y 20 veces superiores, respectivamente, a la concentración mínima inhibitoria determinada por cultivo

planctónico en microplaca para ambas estirpes. La colistina se añadió desde reservorios independientes junto al yoduro de propidio, y se monitorizó su efecto al cabo de las 3 y 24 horas desde su adición al medio. Como control se llevó medio sin adición de colistina.

En todos los experimentos, las imágenes fueron adquiridas en posiciones al azar en la parte anterior del canal de flujo, a una distancia de 5-10 mm de la entrada de medio.

3.1.5.2. Crecimiento de biofilms en placas multipocillo

Se cultivaron las estirpes *P. putida* KT2242 silvestre y mutante *cbrB* (MPO406) en 10 mL de medio LB en matraces de 50 mL durante toda la noche a 30 °C 180 rpm y se diluyeron los cultivos 20 veces en 20 mL de medio LB fresco para cada estirpe y réplica. Se inocularon microplacas *Costar® 96 Well Cell Culture Plate* (Costar) con 8 réplicas por estirpe (en columnas) con 150 µL de cultivo, y 1 microplaca por cada condición/tiempo a cuantificar. Para monitorizar la formación/dispersión de biofilms de las estirpes se incubaron las placas entre 0 y 24 horas a 25 °C y 150 rpm.

Para los ensayos de tratamiento enzimático con distintos compuestos, se incubaron las placas 1, 3 y 5 horas en las mismas condiciones. Transcurrido este tiempo se procedió al tratamiento con proteinasa K (0-100 µg/mL) y metaperyodato sódico (0-40 mM), constituyendo 0 mM el control sin tratar para cada placa y estirpe. A continuación se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación (750 rpm) para homogeneizar el tratamiento.

Seguidamente se midió la densidad óptica (Abs_{600}) en el lector de placas de 96 pocillos *POLARstar Omega* (BMG LABTECH) y se lavaron las placas tres veces en agua en tres recipientes distintos. Una vez eliminado el exceso de agua se tiñó la biomasa con una solución de cristal violeta 0,1 % (200 µL/pocillo), se incubó 15 minutos a temperatura ambiente y se volvió a lavar 3 veces con agua. Una vez secas las microplacas se disolvió el cristal violeta adherido a las microplacas añadiendo 200 µL/pocillo de etanol 96 % (HPLC grade). Se incubó de nuevo 15 minutos a temperatura ambiente pero con agitación de 600 rpm. Finalmente se midieron las placas en el lector de microplacas de 96 pocillos a Abs_{620} nm (medida de biomasa de biofilm) que no interfiere con Abs_{600} .

3.1.5.3. Crecimiento de películas en la interfase líquido-gas

Se cultivaron las estirpes *P. putida* KT2242 silvestre y mutante *cbrB* (MPO406) en 10 mL de medio LB en matraces de 50 mL durante toda la noche a 30 °C y 180 rpm y se diluyeron los cultivos 100 veces en 10 mL de medio LB fresco para cada estirpe y réplica. Las diluciones se vertieron en placas de petri de 8 cm de diámetro y se dejaron crecer durante 3 días a 30 °C en estático. Se

tomaron fotos de las películas una vez eliminado el sobrenadante (Figura 26A en apartado 4.1. de resultados) y a continuación se realizaron los lavados con 2-3 mL de los tampones pertinentes. Finalmente se añadieron 3 mL del mismo tampón o la solución correspondiente. Para el tratamiento con celulasa se usó tampón de acetato de sodio 50 mM pH 5,0 (2,05 g de acetato de sodio (SIGMA, S7545), 500 mL de agua milliQ y ajustado a pH 5,0 y autoclavado) y celulasa de *Aspergillus niger* (SIGMA) a concentración final de 0,5 mg/mL. Para el tratamiento con proteinasa K se usó PUM buffer (22,2 g $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 7,26 g KH_2PO_4 , 1,8 g urea y 0,2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ y 1 L de agua milliQ; ajustado a pH 7,1 y autoclavado) y 1mg/mL final de proteinasa K. Para el tratamiento con metaperyodato sódico se empleó tampón NaCl 0,9 % (9 g de NaCl en 1 L de agua milliQ, autoclavado) y metaperyodato de sodio 40 mM, añadiendo glucosa 41 mM en el caso del control, para que el compuesto rompa los enlaces de glucosa y no de los posibles polímeros. En el tratamiento con DNasa I se usó también el tampón NaCl 0,9 % pero con DNasa I a concentración final de 20 µg/mL. Cada estirpe y tratamiento llevaron un control negativo (ausencia del agente enzimático o presencia de glucosa en el caso del metaperyodato), y se toman fotos al inicio del ensayo (tiempo 0 h) y al cabo de 2 horas de incubación a temperatura ambiente (tiempo 2 h).

3.1.5.4. Cultivos para determinar la resistencia a metales pesados

Para caracterizar la resistencia a metales pesados de las estirpes KT2442, MPO406 y MPO401 se usaron cultivos de estas estirpes en medio LB crecidos toda la noche a 30 °C y 180 rpm. Los cultivos se diluyeron hasta OD_{600} 0,05 en medio fresco LB y se cultivaron hasta OD_{600} 0,5. Entonces se hicieron diluciones seriadas de 10^1 a 10^{10} en 1 mL de tampón fosfato salino 1x y sembraron gotas de 10 µl del cultivo en placas de LB que contenían $ZnCl_2$ 4 mM, $CuCl_2$ 5 mM, $CoCl_2$ 0,6 mM o $NiCl_2$ 2,5 mM. Las diluciones finales en placa fueron de 10^2 - 10^{12} . Se incubaron las placas a 30 °C durante toda la noche y se observó la diferencia cualitativa en el crecimiento de las estirpes en los distintos metales. Se hicieron 3 réplicas biológicas de cada estirpe.

Para cuantificar la viabilidad de las estirpes silvestre y MPO406 en presencia de Zinc y Cobre se procedió de la misma forma que en caso anterior pero sembrando en placas de LB con concentraciones de $CuCl_2$ o $ZnCl_2$ de 3-5 mM y contando el número de colonias, usando como control concentración 0 mM (LB). Se expresó la viabilidad como promedio del porcentaje de supervivencia en presencia del metal respecto a ausencia y su desviación estándar respecto a esas medias, para lo que se usaron 3 réplicas biológicas.

3.1.5.5. Crecimiento en un medio de cultivo con limitación de hierro

Se cultivaron preinóculos de *P. putida* KT2442, MPO401 y MPO406 en medio mínimo con succinato 20 mM y NH₄Cl 20 mM en ausencia de hierro durante toda la noche en tubos de 50 ml (16 horas) y se diluyeron a densidad óptica inicial de 0,05 en 10 ml de medio fresco con FeSO₄ 34 μM o sin hierro de nuevo en tubos de 50 ml. Se monitorizó el crecimiento durante 25 horas a 30°C como medida de Abs₆₀₀

3.1.5.6. Ensayo de movilidad en agar blando

Los ensayos de movilidad por *swimming* se realizaron según el protocolo descrito en la literatura (Rashid y Kornberg, 2000; Robleto y col., 2003). Se usaron placas de medio mínimo con succinato+amonio, prolina 20 mM o triptona-agar, con *Difco agar noble* (BD Diagnostics) 0,2 % Las placas se inocularon con asa de siembra estirada atravesando el agar, desde una placa LB agar 1,5% crecida el día anterior. Las placas se incubaron a 30°C durante 20 horas. Se cuantificó la movilidad midiendo el radio desde el punto de inoculación y refiriendo a la estirpe silvestre y expresó como porcentaje de movilidad relativa en cada medio, con su correspondiente desviación estándar. Se utilizó un total de 6 réplicas biológicas.

Para los ensayos de *swarming* se procedió según lo descrito por Matilla y col. (Matilla y col., 2007). Se empleó agar PG-swarming (proteose peptone No.3 DIFCO 0,5 %, glucosa 0,2 % y bacto agar DIFCO 0,5 %). Las placas se dejaron solidificar 4 horas a temperatura ambiente y se inocularon en su superficie con gotas de 2,5 μl de cultivos saturados en LB de *P. putida* KT2442 silvestre, MPO406 y *fleQ* sin dejar secar la gota. Una vez inoculadas, las placas fueron selladas con parafilm para evitar desecación y se incubaron durante alrededor de 40 horas a 25 °C. Se utilizaron 3 réplicas biológicas, con 2 repeticiones de cada una.

3.1.5.7. Medida de la capacidad de agregación de un cultivo de *P. putida*

Para cuantificar la capacidad de agregación de las estirpes *P. putida* KT2442 silvestre y mutante *cbrB* (MPO406), se cultivaron estas estirpes en 5 ml de medio LB durante toda la noche a 30 °C y 180 rpm. A continuación se diluyeron hasta densidad óptica 1 y se transfirieron 600 μl a una cubeta para medir en el espectrofotómetro. Se monitorizó la pérdida de turbidez a 600 nm durante 30 minutos cada 3 minutos. Se usaron entre 3-6 réplicas de cultivo y se expresó la sedimentación como el porcentaje de Abs₆₀₀ a tiempo final frente al tiempo inicial en valores medios, con su correspondiente desviación estándar, y se representó frente al tiempo.

3.2. Manipulación de ácidos nucleicos.

3.2.1. Preparación de DNA plasmídico.

Las preparaciones de DNA plasmídico de *E. coli* DH5 α se realizaron siguiendo dos procedimientos distintos, en función de las aplicaciones posteriores. Si se requería DNA de bastante pureza, como por ejemplo para secuenciaciones o para digerirlo con el fin de realizar una clonación, se usó el kit *NucleoSpin® Plasmid* (Macherey-Nagel) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este procedimiento también se empleó cuando la estirpe de la que se quería obtener el DNA plasmídico no era DH5 α . Para el resto de aplicaciones se usó el protocolo simplificado de lisis alcalina (Stephen y col., 1990). A partir de un sedimento de células procedente de 3 mL de cultivo saturado en LB, se resuspendió en 100 mL de solución GTE (glucosa 50 mM, EDTA 10 mM, Tris HCl 25 mM (pH 8)) y se incubó 5 min en hielo. A continuación se añadieron 200 mL de solución II recién preparada (NaOH 0,2 N, SDS 1%), mezclando por inversión e incubando 5 min en hielo. Luego se añadieron 150 mL de solución III (acetato potásico 3 M pH 4,8), y se mezcló por inversión, incubándose al menos otros 5 min en hielo. Los restos celulares se eliminaron por sedimentación centrifugando durante 10 min a 16100 g, y el DNA presente en el sobrenadante se precipitó añadiendo 1 volumen de etanol 96% a -20 °C, centrifugando inmediatamente durante 10 min a 16100 g. El precipitado se lavó con 1 mL de etanol 70% frío, y se centrifugó 2 min a 16100 g. Dicho precipitado se secó al vacío y se resuspendió en TER (Tris HCl 10 mM (pH 8), EDTA 1mM (pH 8) con 20 mg/l de ribonucleasa) Las preparaciones de plásmidos se almacenaron a 4 °C o -20 °C.

3.2.2. Preparación de DNA cromosómico.

Las extracciones de DNA cromosómico tanto de *E. coli* como de *P. putida* se realizaron con el kit *Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega), partiendo de 1 a 5 mL de cultivo saturado en medio LB, siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.2.3. Amplificación de DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Cuando fue necesario amplificar fragmentos de DNA para su posterior clonación, se realizaron reacciones de PCR utilizando el DNA correspondiente como molde. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 50 μ l en tubos de 0,2 mL, en presencia de los oligonucleótidos adecuados a una concentración de 1 mM, dNTPs a 100 μ M y 1 unidad de DNA polimerasa termorresistente de alta fidelidad (*Expand High Fidelity PCR System*, Roche; *ipfu DNA polymerase*,

USB), en el tampón que suministra la casa comercial, que lleva $MgCl_2$ a una concentración final de 1,5 mM. Como molde se usó, según el caso, 50 ng de DNA cromosómico de *P. putida* o *E. coli* o 5 ng de DNA plasmídico.

El programa de PCR del termociclador varió en función del tamaño y naturaleza del fragmento a amplificar, pero en líneas generales consistió en:

a) Desnaturalización inicial: 5 min para molde cromosómico o 2 min para molde plasmídico a 94 °C

b) 30 ciclos:

- 45 s a 94 °C (etapa de desnaturalización)

- 30 s a temperatura variable en función de la temperatura de desnaturalización (T_m) de los oligonucleótidos (etapa de apareamiento)

- 60 s por kilobase de DNA a amplificar a 72 °C (etapa de extensión)

c) Extensión final: entre 5 y 7 min a 72 °C

3.2.4. Electroforesis de DNA.

Para separar y visualizar fragmentos lineales de DNA se empleó la técnica de electroforesis en gel. En general, si el fragmento de interés era superior a 100 pb se utilizaron geles de agarosa de baja electroendósmosis, cuya concentración osciló entre 0,7% y 2% dependiendo de los tamaños a separar, en tampón TAE 1X (Trisácido acético 40 mM, 2 mM EDTA, pH 7,7). Estos geles se sometieron a una diferencia de potencial fija de entre 90 y 120 v. Por el contrario, si el fragmento de interés era inferior a 100 pb se usaron geles verticales no desnaturalizantes de poliacrilamida (acrilamida:bisacrilamida 29:1), cuya concentración varió entre el 5% y el 8% para una mejor resolución en función del tamaño del fragmento, en TBE 0,5x (Tris-ácido bórico 45 mM, EDTA 1 mM, pH 8,3). En este caso los geles se sometieron a una corriente fija de 30 mA. En ambos casos, se utilizó el marcador de peso molecular comercial *1 Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen). Antes de cargarlas en el gel, las muestras se mezclaron con 1/6 del volumen final de tampón de carga (Tris-HCl 10 mM, (pH 8); Na_2EDTA 1 mM (pH 8); glicerol 30% (v/v), azul de bromofenol 0.25% (p/v) y xylene cyanol 0.25% (p/v)). Después de la electroforesis, el gel se tiñó en una solución de bromuro de etidio 1 mg/l y las bandas de DNA se visualizaron en un transiluminador de radiación ultravioleta (Vilber Lourmat) y se fotografiaron y cuantificaron con una cámara acoplada a una impresora de impresión térmica.

3.2.5. Aislamiento y purificación de fragmentos de DNA.

Los fragmentos se identificaron mediante visualización con un transiluminador de radiación ultravioleta de baja energía y se aislaron recortando los mismos del gel. Para purificar estos fragmentos de DNA éste se separó en gel de agarosa, el fragmento se purificó con illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.2.6. Clonación de fragmentos de DNA en plásmidos.

La clonación de fragmentos de DNA se realizó esencialmente como está descrito por Sambrook (Sambrook, 2000). Los fragmentos de DNA, procedentes de un plásmido o de una reacción de PCR se cortaron con las enzimas de restricción adecuadas en cada caso (procedentes de las compañías Roche, New England Biolabs o Fermentas) en el correspondiente tampón de reacción suministrado por el fabricante.

Cuando fue necesario, se empleó el fragmento Klenow de la DNA polimerasa para rellenar extremos 5' protuberantes, o la DNA polimerasa de T4 para eliminar extremos 3' protuberantes. Posteriormente, y tras purificar los fragmentos deseados de gel como se ha descrito anteriormente y cuantificarlos, se mezclaron para realizar una reacción de ligación en tampón quinasa (0,5 M Tris-HCl (pH 7,6), 0,1 M MgCl₂, 50 mM DTT, 500 mg/L de BSA) con ATP 1 mM si los fragmentos a ligar tenían extremos cohesivos o ATP 0,1 mM si los fragmentos a ligar tenían alguno de los extremos romo. Cada ligación se realizó en un volumen final de 10 mL en presencia de 1 unidad de DNA ligasa de T4, y se incubó al menos 12 h a 16 °C. Finalmente se transformó la estirpe *E. coli* DH5α competente (según el método citado en el apartado 3.2.9) con la mezcla de ligación, sembrando en medio de cultivo con el antibiótico adecuado para la selección del plásmido en el que se realizaba la clonación. Los clones obtenidos se comprobaron mediante secuenciación, si el fragmento clonado provenía de PCR, o por restricción, seleccionando un clon positivo para congelarlo por duplicado en la colección de estirpes del laboratorio.

3.2.7. Transferencia de plásmidos por conjugación.

La transferencia de plásmidos desde *E. coli* a *P. putida* se llevó a cabo por conjugación triparental, utilizando para ello la estirpe de *E. coli* DH5α con el plásmido auxiliar pRK2013 (Figurski y Helinski, 1979). A partir de cultivos saturados crecidos en medio LB de las estirpes adecuadas en cada caso (la estirpe de *E. coli* donadora, la de *P. putida* receptora y la estirpe auxiliar), se tomó 1 mL de cada estirpe, se lavaron con LB fresco para eliminar los antibióticos del medio de cultivo, y se hizo

una mezcla con 0,3 mL de cada estirpe. Esta mezcla se centrifugó, se eliminó la mayor parte del sobrenadante y el sedimento de células se resuspendió en el volumen residual de medio. Las células resuspendidas se depositaron en forma de gota (parche de conjugación) en una caja de LB sólido, y se incubaron durante un mínimo de 8 horas a 30 °C. Posteriormente se segregó parte del parche en una caja de LB con los antibióticos adecuados para la selección de la transferencia del plásmido. Se añadió X-gal para comprobar la funcionalidad del gen de la β -galactosidasa en los plásmidos que lo portaban.

3.2.8. Obtención de células competentes.

Para la transformación de *E. coli* DH5 α con mezclas de ligación las células se hicieron competentes siguiendo el método de Inoue y col. (Inoue y col., 1990), con el que se consigue una alta frecuencia de transformación (hasta 10⁹ transformantes por μ g de ADN plasmídico) y que permite la conservación de las células competentes a -80 °C por un prolongado espacio de tiempo sin una disminución importante de la competencia.

Para la preparación de células electrocompetentes de *P. putida* se usó el método descrito en Choi y col. (Choi y col., 2006) basado en el lavado de las células con sacarosa 300 mM y con el que se consiguen del orden de 10⁹-10¹⁰ bacterias viables.

3.2.9. Transferencia de plásmidos por electroporación.

Para la transformación de plásmidos por electroporación se usaron habitualmente 5 ng de plásmido y 100 μ l de células electrocompetentes de *P. putida* descritas en 3.2.9, dando un pulso con el protocolo Ec2 de un electroporador *Micropulser*TM (Biorad) y cubetas de 0,2 mm. Inmediatamente se añadió 1 mL de LB, se homogenizó la mezcla y se transfirió a un vial de 1.5 mL que se incubó 1-2 horas a 30 °C en agitación.

Para la integración de fragmentos en el cromosoma mediante el sistema Tn7 se procedió de forma similar pero se usó 1 μ g del plásmido donador del fragmento (derivado de pBKminiTn7- Ω Gm), 1 μ g del plásmido helper pUX-BF13 (enzimas de la transposasa) y 100 μ l de células electrocompetentes de *P. putida*. La mezcla se transfirió a cubetas de electroporación de 0,2 mm de paso, se aplicó un pulso eléctrico y se añadió 1 mL de LB. La mezcla de electroporación se incubó 3 horas a 30 °C en agitación.

Se hicieron diluciones de la mezcla y se sembraron en cajas de LB con los antibióticos adecuados para la selección de la transferencia del plásmido o integración del fragmento.

3.2.10. Transferencia de plásmidos por transformación mediante choque térmico.

Para la transformación se mezclaron entre 50 y 150 mL de células competentes con 1 mL de preparación de plásmido o 10-15 mL de mezcla de ligación y se incubaron 30 min a 4 °C. Después se sometieron a un choque térmico de 42 °C durante 40 s, se enfriaron rápidamente en hielo y se les añadió 1 mL de LB. Se incubaron durante 60-90 min a 37 °C, se sembraron cajas de LB con el antibiótico de selección del plásmido y se incubaron toda la noche a 37 °C.

3.2.11. Secuenciación de DNA.

Las reacciones de secuenciación para confirmar la presencia o ausencia de mutaciones en el DNA clonado fueron llevadas a cabo por las empresas Sistemas genómicos S.L. (Valencia) y Secugen (Madrid). Para la comparación de las secuencias obtenidas con las bases de datos se utilizó el paquete de herramientas BLAST (Altschul y col., 1997) disponible en la página web del NCBI (<http://ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

3.2.12. Preparación de RNA total.

Las extracciones de RNA se realizaron a partir de distintos volúmenes de cultivo en función del experimento a realizar. Así, para los ensayos de microarrays y sus PCR cuantitativas confirmativas se utilizaron 120 mL de cultivo de partida, mientras que para la determinación del inicio de la transcripción se utilizaron cultivos de 25 mL. En cualquier caso, cuando los cultivos alcanzaron la densidad óptica adecuada en cada caso se recogieron las células en alícuotas de 2 mL en frío y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido. Las alícuotas se guardaron a -80 °C hasta el momento de ser procesadas. Posteriormente, cada alícuota se resuspendió en 0,5 mL de *TriPure Isolation Reagent* (Roche), que contiene fenol e isocianato de guanidinio, y se incubaron 10 min a 60 °C para lisar las células. Tras juntar las alícuotas dos a dos, se centrifugaron 10 min a 16100 g y a 4 °C para eliminar restos celulares y se transfirieron a tubos de *Phase Lock Gel*TM (Eppendorf) precompactados. Se les añadió 200 µL de cloroformo, se agitaron por inversión y se incubaron a 4 °C durante 15 min. Después se centrifugaron 15 min a 16100 g y a temperatura ambiente y se añadieron 400 mL de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1), se agitaron por inversión y se centrifugaron 5 min a 16100 g y a 4 °C. Se transfirió la fase acuosa a otro tubo y se precipitó con 1 volumen de isopropanol durante 10 min a 4 °C. Tras un lavado con etanol 70% previamente enfriado

se secaron los precipitados y se resuspendieron en un volumen de 50 a 150 mL de H₂O DEPC, dependiendo del uso posterior del RNA.

Para las reacciones de extensión desde el cebador (*primer extension*), el RNA se resuspendió en 50 µl de H₂O DEPC, se cuantificó midiendo la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro *NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer* (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) se visualizó en gel de agarosa para verificar la exactitud de la cuantificación y comprobar su integridad y se congeló a -80 °C.

Para los ensayos de microarrays o PCR cuantitativa, el RNA se resuspendió en 150 µl de H₂O DEPC y se realizó un tratamiento con DNasa I, en presencia de 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 20 U de inhibidor de RNasas (RNase OUT, Invitrogen) y 10 U de DNasa I (Roche) en un volumen final de 200 µL. Se incubó a 37 °C durante 1 h. Posteriormente las muestras se fenolizaron 2 veces con fenol: cloroformo: isoamílico (25:24:1) en tubos de Phase Lock Gel precompactados y una vez más con fenol ácido (sin Phase Lock Gel), y se precipitaron a -80 °C durante al menos 30 min con 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M (pH 5,2) y 2,5 volúmenes de etanol 96% preenfriado. A continuación se centrifugó durante 30 min a 16100 g y a 4 °C, se lavó con etanol 70% y se resuspendieron los precipitados en 100 µL de H₂O DEPC. Las muestras de RNA se cuantificaron en el NanoDrop y se visualizaron en gel de agarosa para verificar la cuantificación y comprobar su integridad. Posteriormente, y para obtener una mayor pureza, las preparaciones de RNA se sometieron a un segundo tratamiento con DNasa (kit Turbo DNA Free de Ambion) siguiendo las instrucciones del fabricante. Por último, las muestras se limpiaron una vez más, eliminando gran parte del RNA ribosómico 5S con el kit RNeasy mini kit (Qiagen), usando el protocolo Clean Up y eluyendo cada muestra en 50 µL de H₂O del kit. Para comprobar la ausencia de contaminación con DNA se llevó a cabo una PCR con el kit PCR beads (GE Healthcare) según las instrucciones del fabricante, utilizando 500 ng de RNA como molde y oligonucleótidos que amplificaban regiones de genes de alta expresión, como son el gen del RNA 16 S o el de la proteína ribosómica 28 S (primers nuoA 1Q y 2Q o L28 1Q y 2Q, respectivamente). Las muestras de RNA fueron guardadas a -80 °C hasta el momento de su uso.

3.2.13. Hibridación de sondas de DNA (Southern blotting)

Para la comprobación de los mutantes MPO406 y MPO401 por southern blotting se sintetizaron por PCR sondas flanqueantes al gen *cbrB* que se denominaron cbrBL y cbrBR, utilizando los oligonucleótidos cbr-1/ cbr-3 y cbr-2/ cbr-6, respectivamente, utilizando el protocolo de PCR descrito y con 90 segundos como tiempo de extensión puesto que el tamaño del fragmento a

amplificar era de alrededor 1,5 Kb. Los productos de PCR se purificaron de un gel de agarosa 0,8 % s con el kit Purification of PCR products and gel shifts (GE Healthcare), eluyendo en un volumen final de 30 µl de agua milliQ. Las sondas purificadas se marcaron con digoxigenina empleando 2 µl de Dig Labelling mix 10x (Roche), 2 µl de Hexanucleotide mix 10x (Roche) y 1 U de enzima Klenow (Roche) en un volumen de 20 µl y se incubó la mezcla 13 horas a 37 °C.

Se digirieron 6 µg de DNA cromosómico de las distintas estirpes con las enzimas *Sall/BamHI* usando 5 µl de enzima Fast Digest[®] (Fermentas) de cada una e incubando 13 horas a 37°C en un volumen final de 20 µl. Se separó el DNA digerida en función de su tamaño en un gel de agarosa 0,7 % migrado a 70 V durante aproximadamente 7 horas. Se llevó a cabo una despurinización del gel con HCl 0,25 N durante 20' para favorecer la fragmentación del DNA y tras lavar con agua destilada se desnaturalizó con 1,5 M NaCl + 0,5 M NaOH 30'. El gel se lavó dos veces durante 15 minutos con solución 1 M Tris+1.5 M NaCl pH 7,4 se procedió a la transferencia del DNA a una membrana Hybond-N+(GE Healthcare) mediante capilaridad, usando como tampón SSC 20x (3 M NaCl+300 mM Citrato sódico pH 7,0) y como mecha papel Whatman (3 mm espesor) y dejando toda la noche a temperatura ambiente. La membrana se lavó con SSC 2x, se secó por completo y se realizó el crosslink por irradiación ultravioleta durante 1 minuto. Se comprobó la transferencia por tinción del gel con bromuro de etidio 1 mg/mL.

La hibridación de la membrana co el DNA transferido y la sonda marcada con digoxigenina se realizó en un horno de hibridación Hybridiser HB-3D (Techne). La solución de prehibridación (SSC 5x, N-laurilsarcosina 0,1 %, SDS 0,2 %, blocking reagent 1 %, formamida 50 % y agua destilada) se precalentó 10 minutos a 65 °C y a continuación se añadieron 125 µl de DNA de espermatozoos de salmón hervido (10 mg/mL) por cada 25 mL de solución de prehibridación y se dejó atemperando otros 10 minutos a 65 °C. En los tubos de hibridación se añadió la solución de prehibridación precalentada cubriendo toda la membrana y se incubó durante 1 hora a 42 °C. En caso de sondas de nueva síntesis (cbrBL y cbrBR) se desnaturalizó a 100 °C 10 minutos con carácter previo a la hibridación, para sondas reutilizadas (Kanamicina) se omitió este paso. Cuando la sonda era reutilizada se reemplazaba la solución de prehibridación por la de hibridación, cuando la sonda era nueva se añadía la sonda marcada y purificada a la solución de prehibridación (previa desnaturalización). Se dejaron hibridando las sondas alrededor de 20 horas a 42 °C en el horno de hibridación.

Las membranas se lavaron dos veces durante 5 minutos con 50 mL de solución SSC 2x a temperatura ambiente manualmente y 2 lavados de 15 minutos con solución SSC 0,1x precalentada a 68 °C, usando el horno de hibridación. Para la detección se retiró la solución de lavado y se equilibraron las membranas 1 minuto en Tampón 1 (ácido maleico 100 mM pH 7,5, NaCl 150 mM y

agua). A continuación se añadieron 40 mL de solución de bloqueo 1 % (4 mL de blocking reagent 10 % en 36 mL de tampón 1) y se incubó al menos 1 hora a temperatura ambiente en el agitador de sobremesa Unimax 1010 (Heidolph). Se le añadió 4 µL de anti-Dig-fosfatasa (Roche), se homogeneizó la mezcla y se incubó durante 30 minutos en agitación. Se lavaron las membranas dos veces en 40 mL de Tween 20 0,3 % (en tampón 1) durante 15 minutos. Se retiró la solución de lavado y se equilibró 2 minutos en 20 mL de tampón 3 (Tris HCl 100 mM pH 9,5) y se añadió NaCl y MgCl₂ 50 a 100 mM y 50 mM respectivamente. Para revelar el southern se añadió CSPD (Roche) con dilución 1:300, se homogenizó y se incubó 5 minutos en agitación. Finalmente se pusieron las membranas en bolsas de hibridación eliminando cualquier burbuja. Se incubó durante 15 minutos a 37 °C para activar la fosfatasa alcalina. Se expusieron las membranas 1 y 24 horas con películas de radiografías en cassettes de exposición y usando la máquina de revelado.

3.2.14. Construcción del doble mutante *cbrB ntrC*, MPO400

Para construir el mutante *cbrB ntrC* se electroporó el mutante MPO406 (*cbrB::miniTn5luxABKm*) con el plásmido suicida pMPO215 (Garcia-Gonzalez y col., 2005) y seleccionó la doble recombinación en placas de medio LB con 10 % de sacarosa. Las colonias resistentes a sacarosa (Sac^r) se comprobaron en placas de medio LB con tetraciclina (resistencia del cassette) y estreptomicina (resistencia del vector). Se comprobaron colonias Sac^r Tc^r Sm^s por PCR, que habrían reemplazado el gen *ntrC* silvestre por la copia interrumpida, y se comprobó el crecimiento en medio mínimo con arginina y ornitina 20 mM como fuentes de carbono y nitrógeno. El mutante resultante se denominó MPO400.

3.2.15. Construcción del mutante de delección *cbrB*, MPO401

Para la construcción del mutante de delección de *cbrB* MPO401, se amplificaron mediante PCR los fragmentos flanqueantes al gen *cbrB* usando los oligonucleótidos *cbrB*-3 (*SpeI*) y *cbrB*-1 (*SfiI*) para amplificar la región izquierda y *cbrB*-2 (*SfiI*) y *cbrB*-4 (*Clal*) para la región flanqueante derecha, usando siempre DNA genómico como molde. La clonación de estos fragmentos de forma dirigida en el plásmido pBluescript SK⁺ digerido con *SpeI/Clal*, resultó en el plásmido pMPO467. La resistencia a Kanamicina se obtuvo de pUTminiTn5-Km por digestión *SfiI*, y el fragmento *SfiI* de 2.3 Kb se clonó en el vector pMPO467 digerido con *SfiI* para obtener el plásmido pMPO471. Este plásmido, no replicativo en *P. putida*, se transfirió por electroporación a la estirpe KT2442 según Choi y col. (Choi y col., 2006) y se seleccionaron colonias resistentes a Kanamicina 50 µg/mL. Se envejecieron los cultivos para favorecer la doble recombinación puesto que la selección en Kanamicina seleccionaba tanto eventos de recombinación simple, integración del plásmido por recombinación por las regiones homólogas izquierda o derecha, como de doble recombinación por resolución de la recombinación al

sustituir el gen por el cassette de Kanamicina. Posteriormente se sembró en medio con Kanamicina el cultivo envejecido y se hicieron réplicas de las colonias a Carbenicilina para comprobar la escisión del plásmido y a medio mínimo con arginina 20 mM, que un mutante *cbrB* no es capaz de utilizar como fuente de carbono o nitrógeno. A la estirpe resultante se le denominó MPO401, carente del gen *cbrB* salvo sus 130 primeros nucleótidos.

3.3. Manipulación de proteínas.

3.3.1. Electroforesis desnaturizante de proteínas en geles de poliacrilamida-SDS.

Para analizar la cantidad de proteína total de la célula se centrifugó 1 mL de cultivo y se resuspendió en 25 mL de agua por cada unidad de DO600 del cultivo. A esto se le añadió 1 volumen de tampón de carga 2X (Tris-HCl 160 mM (pH 8), glicerol 20% (v/v), SDS 4%, azul de bromofenol 0,1%, β -mercaptoetanol 10% (v/v)), se hirvió 5 min y se centrifugó para eliminar los restos celulares, utilizando normalmente 5-10 μ l del sobrenadante para visualizar las proteínas en gel. Cuando se analizaron extractos de proteína soluble simplemente se les añadió 1 volumen de tampón de carga 2x antes de cargarlos en el gel. Las proteínas fueron analizadas mediante electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida con SDS 0,1% (p/v), básicamente según el método descrito por Laemmli (Laemmli, 1970). La electroforesis de proteínas se realizó en geles de poliacrilamida-SDS discontinuos, consistentes en una parte superior de empaquetamiento (Tris-HCl 125 mM (pH 6,8), SDS 0,1%, acrilamida:bisacrilamida 4% (37,5:1), persulfato amónico 0,1%, TEMED 0,1% (v/v)) y una parte inferior de separación (Tris-HCl 375 mM (pH 8,8), SDS 0,075%, acrilamida:bisacrilamida 12% (37,5:1), persulfato amónico 0,033%, TEMED 0,067% (v/v)). Como marcador de peso molecular se usó el marcador Prestain broad range standar (Bio-Rad), compuesto por una mezcla de ocho proteínas de entre 6,5 y 200 kDa. La electroforesis se realizó en Tank Buffer 1X (Trizma base 25 mM, glicina 19,2 mM y SDS 0,1% (p/v)) a una intensidad de corriente fija de 30 mA. El gel se lavó brevemente con agua y se tiñó con EZBlue Gel Staining Reagent (Sigma) siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente se lavó un par de veces con agua para aumentar el contraste entre las proteínas teñidas y el resto del gel y se secó en un secador de geles Hoefer™ Slab Gel Dryer CD 2000 (GE Healthcare) durante 1 hora a 80°C.

3.3.2. Detección de proteínas en PAGE por reconocimiento antígeno-anticuerpo (Western blot)

Se realizó una electroforesis convencional en gel de poliacrilamida-SDS cargando 8 µl de extracto soluble (1:1 extracto:tampón de carga con β-mercaptoetanol). Se activó la membrana de *PVDF Hybond-P* (GE Healthcare) 10 segundos en metanol, se lavó con agua destilada y se equilibró junto con el gel en tampón de transferencia (5 g/L de Tris, 14,4 g/L de glicina, 1 g/L de glicerol, y 20 % (v/v) de metanol) durante al menos 15 minutos. La transferencia de las proteínas desde el gel a las membranas se realizó en frío usando el sistema de transferencia *Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell* (BioRad) fijando una diferencia de potencial de 100 V y una intensidad de corriente de 350 mA durante una hora. Una vez terminada la transferencia, la membrana se lavó 3 veces con TTBS 1x durante 5 minutos y se incubó durante 2 horas en solución de bloqueo (Tris-HCl 15 mM pH 7,5, NaCl 0,2 M, 50 g/L de leche en polvo desnatada). A continuación se añadió el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo (1:1000) y se dejó incubar toda la noche a 4 °C con agitación. A la mañana siguiente, se retiró el anticuerpo primario y se lavó la membrana 4 veces con tampón TTBS 1x (Tris-HCl 15 mM pH 7,5, NaCl 0,2 M y 0,05 % (v/v) de Tween-20) durante 10 minutos cada vez, para retirar el anticuerpo sin unir. Luego se incubó la membrana durante 2 horas con el anticuerpo secundario, anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano (HRP-Ig, Sigma) diluido 3000 veces en solución de bloqueo. Finalmente, se repitieron los lavados con TTBS 1x (4 lavados de 10 minutos) y para detectar el anticuerpo se usó el kit de revelación *SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate* (Thermo Scientific) mezclando 350 µl de cada solución y dejando actuar durante 5 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación, se secó el exceso de reactivo de la membrana y ésta se usó para impresionar una película de rayos X durante el tiempo necesario (entre 0 segundos y 2 minutos).

3.4. Análisis de la expresión génica.

3.4.1. Ensayos de actividad β-galactosidasa.

Todos los ensayos de actividad β-galactosidasa de las fusiones a *lacZ* se realizaron siguiendo el método descrito por Miller. En todos los casos partimos de un preinóculo saturado en 10 ml de medio LB cultivado en matraz de 50 mL. Los preinóculos se lavaron 1 vez con tampón fosfato salino 1x y se diluyeron en LB o LB+benzoato 5 mM hasta densidad óptica 0,05. Se monitorizó el crecimiento de las estirpes silvestre y mutantes *cbrB* con la fusión transcripcional *benA::lacZ* integrada en el cromosoma (silvestre, MPO458; *cbrB*:Km, MPO459; Δ*cbrB*, MPO461) a lo largo de 5 horas de crecimiento a 30 °C y 180 rpm en matraces.

En cada punto de medida se tomaron 100 µL de cultivo (o de una dilución del mismo si se preveían actividades muy altas) y se mezclaron en hielo con 650 µL de tampón Z con β-mercaptoetanol (Na₂HPO₄ 60 mM, NaH₂PO₄•H₂O 40 mM, KCl 10 mM, MgSO₄ •7H₂O 1 mM, β-mercaptoetanol 0,27 % (v/v)), 30 µL de cloroformo y 20 µL de SDS 0,01 % (p/v). La mezcla se homogeneizó en el vórtex y se tuvo al menos 5 minutos a 30 °C antes de añadirle 200 µL de ONPG 13 mM (o-nitrofenil galctopiranosido, preparado en tampón Z). Se volvió a homogenizar en el vórtex hasta que la mezcla se puso amarilla, momento en el que se paró la reacción añadiendo 500 µL de carbonato sódico (Na₂CO₃), se centrifugó la mezcla 15 minutos a 9300 g y se midió el color amarillo del sobrenadante en el fluorímetro a 420 nm. Para calcular la actividad β-galactosidasa de cada muestra en unidades Miller aplicamos la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad } \beta - \text{galactosidasa (en unidades Miller)} = 1000 \times \frac{A_{420}}{V \times t \times \text{Abs}_{600}}$$

Donde A₄₂₀ es la absorbancia a 420 nm, V el volumen de cultivo usado en el ensayo en mL (normalmente 0,1 mL), A₆₀₀ es la densidad óptica del cultivo en el momento de empezar el ensayo y t es el tiempo de reacción en minutos (desde la adición del ONPG hasta la adición de Na₂CO₃).

En todos los casos se realizaron al menos 3 réplicas independientes de un experimento con dos réplicas técnicas de cada cultivo, mostrando los valores medio y desviaciones estándar entre dichas réplicas.

3.4.2. Retrotranscripción de RNA.

Para retrotranscribir RNA se emplearon distintos protocolos en función del uso posterior del DNA complementario (cDNA).

- Para los ensayos de microarrays se retrotranscribieron 20 µg de RNA para cada condición usando el kit *SuperscriptTM Indirect cDNA Labeling System* (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante.
- Para ensayos de PCR cuantitativa se retrotranscribieron 3-10 µg de RNA para cada muestra con el kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.4.3. Microarray genómico de *Pseudomonas putida* KT2440.

El diseño y desarrollo de un microarray genómico de *Pseudomonas putida* KT2440 se llevó a cabo en el seno de un proyecto conjunto en el que participaron grupos que investigan distintos aspectos de esta bacteria (GEN2001-4698C05) en colaboración con la empresa Progenika Biopharma (<http://www.progenika.com>). El microarray desarrollado contiene 5557 sondas consistentes en oligonucleótidos con una longitud estándar de 50 nucleótidos cada uno, impresos por duplicado en portaobjetos de 25 mm x 75 mm tratados con g-aminosilano, a los que se unieron covalentemente con luz ultravioleta y calor. Los puntos de impresión de las sondas tienen 180 nm de diámetro y están separados entre sí por 265 nm, organizándose en 48 subarrays de 16 columnas y 15 filas cada uno. El área total impresa del portaobjetos es aproximadamente de 18 x 53 mm. Los oligonucleótidos, diseñados por BioAlma (<http://www.bioalma.com>), son específicos de cada pauta abierta de lectura en el array, y éstas incluyen las 5350 pautas abiertas de lectura anotadas en el genoma de *P. putida* KT2440 (obtenidas de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, Refseq NC_002947; GenBank Accession No. AE015451.1), las 140 pautas abiertas de lectura del plásmido TOL pWW0 (obtenidas de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, Refseq NC_003350; GenBank Accession No. AJ344068.1), y otros genes de diverso origen como genes comúnmente usados como reporteros (*gfp*, *lacZ*), genes de resistencia a antibióticos o el gen *atzD*, implicado en la degradación de atrazina en *Pseudomonas* sp. ADP. Las sondas para la detección de los genes *rpoD* y *rpoN* fueron impresas en 20 posiciones a lo largo de todo el array para usarse como controles de homogeneidad. Por último también se colocaron, en 203 posiciones por duplicado a lo largo del array (406 puntos), controles negativos con el tampón de impresión (DMSO 50% (v/v)). En total, el microarray contiene 11520 puntos. Este microarray fue validado por Yuste y col. (Yuste y col., 2006).

3.4.4. Análisis de la expresión global mediante microarrays de DNA.

Para los experimentos de microarrays se preparó un preinóculo de 25 mL en medio mínimo con succinato como fuente de carbono y amonio como fuente de nitrógeno de cada estirpe de *P. putida* a analizar; se diluyó tras 16 h en el mismo medio y se incubó durante 4 horas hasta una Abs₆₀₀ de 0,6. Entonces se lavaron las células tres veces en tampón fosfato salino 1x y se diluyó hasta Abs₆₀₀ de 0,15 en 120 mL de medio mínimo con la L-aminoácidos 0,6 mM como fuente de carbono y nitrógeno y se incubó 2 horas (fase exponencial). Después se extrajo el RNA total y se retrotranscribió, tal y como se describe en los apartados 3.2.12 y 3.4.2.

Tras la retrotranscripción del RNA, se procedió a la hidrólisis del mismo y posterior purificación del cDNA siguiendo el protocolo del kit *SuperscriptTM Indirect cDNA Labeling System* (Invitrogen), resuspendiendo finalmente el mismo en 5 mL de tampón de acoplamiento 2x del kit.

A continuación se realizó el marcaje fluorescente indirecto del cDNA siguiendo el protocolo del kit *SuperscriptTM Indirect cDNA Labeling System* y utilizando los fluoróforos del kit *CyDye Post-Labeling Reactive Dye Pack* (GE Healthcare). Cada una de las dos condiciones a comparar (silvestre vs. MPO406 o MPO201 vs. MPO400) se marcó con un fluoróforo (Cy3 o Cy5), llevando en paralelo réplicas técnicas con el marcaje de cada condición con el fluoróforo contrario para evitar posibles desviaciones derivadas de la naturaleza química de cada fluoróforo, que impide que el marcaje sea completamente equivalente. Cada alícuota de fluoróforo se usó en dos reacciones, para lo cual se resuspendió en 5 µl de DMSO, se añadió 2,5 µl a cada cDNA y se completó el volumen de reacción hasta 10 µL con H₂O. Posteriormente se purificaron las reacciones con las columnas del kit y se cuantificó la cantidad de fluoróforo incorporado en el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). Para cada microarray se mezcló la misma cantidad de fluoróforo de cada condición y se secaron completamente en oscuridad en un concentrador al vacío *SpeedVac[®]* (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA).

Los portaobjetos que contenían los microarrays se limpiaron con aire comprimido y se incubaron con solución de bloqueo precalentada (SSC 5x, SDS 0,5%, BSA 1%), en tubos de 50 mL durante 45 min a 42 °C. Posteriormente se sumergieron brevemente primero en H₂O y luego en isopropanol, ambos a temperatura ambiente, dejándose secar finalmente al aire.

Se añadieron 35 µL de solución de hibridación (formamida 50%, SSC 3x, SDS 1%, solución Denhardt's 5x, dextran sulfato 0,5%) atemperada a 42 °C a cada mezcla de cDNAs y se desnaturalizaron durante 5 min a 95 °C. Luego se centrifugaron durante 2 min a 10000 g y se depositó cada mezcla en un cubreobjetos de 60 mm x 24mm previamente limpiado con aire comprimido. El portaobjetos con el microarray previamente bloqueado se colocó con la parte impresa sobre el cubreobjetos, de forma que la muestra se distribuyó por capilaridad a lo largo de toda la superficie de contacto. Se colocó cada uno en una cámara de hibridación manual a la que se le habían puesto dos gotas de 5 mL de SSC 3x para preservar la humedad, se cerraron herméticamente y se sumergieron en un baño a 42 °C para su hibridación con el cDNA marcado durante 18 horas.

Tras la hibridación, los microarrays se sometieron a una serie de lavados a en tubos de 50 mL, todos de 5 min en agitación. Primero se sumergieron en solución de lavado 1 (SSPE 0,5x, 0,1% tween 20) a 37 °C, moviéndolos suavemente para despegar el cubreobjetos y se tuvieron en esta solución 5 min con agitación a 37 °C. Luego se realizaron otros dos lavados en solución 1, tres lavados en solución 2 (SSPE 0,5x) y finalmente un lavado en solución 3 (SSPE 0,1x), todos a temperatura

ambiente. Tras los lavados los microarrays se centrifugaron inmediatamente durante 5 min a 2000 *g* para eliminar la solución de lavado en tubos de 50 mL con una bola de papel absorbente en el fondo, con el código de barras hacia abajo.

A continuación se escanearon los microarrays en un escáner *GenePix*® 4000B, utilizando el software GenePix Pro 5.0 (Axon Instruments) a una resolución de 10 mm por píxel, empleando un láser rojo (635 nm) y otro verde (532 nm) para la detección de Cy5 y Cy3, respectivamente. Para obtener un buen balance entre los canales rojo y verde se escaneó ajustando las intensidades del fotomultiplicador de cada canal, pues aunque se mezcla siempre la misma cantidad de marca fluorescente el distinto comportamiento químico de los fluoróforos hace conveniente este ajuste. Éste se llevó a cabo asumiendo que la mayoría de los genes del genoma no cambian su expresión en respuesta a distintas condiciones, es decir, la mayor parte de los puntos del microarray deben aparecer con la misma intensidad de rojo que de verde (amarillos).

Del microarray 1 se realizaron 3 réplicas biológicas, integrando los datos de 8 réplicas técnicas (incluyendo las inversiones de fluoróforo), mientras que del microarray 2 se emplearon 4 réplicas biológicas, integrando los datos de un total de 10 réplicas técnicas. El análisis bioestadístico se realizó mediante el paquete Almacen de BioAlma (<http://www.bioalma.com>). Se usó el método Lowess como método de normalización global entre réplicas y se calcularon los *p*-values (valores de probabilidad *P*) para cada gen con el algoritmo del test de Student basándose en las diferencias entre el log2 de la proporción entre las dos condiciones en cada réplica. Se consideraron genes expresados diferencialmente en las dos condiciones analizadas aquellos cuyo nivel de cambio fue igual o superior a -1.8 y cuyo *p*-value fue menor o igual a 0,05 (Benjamini y col., 2001).

3.4.5. PCR cuantitativa (RT-qPCR).

Esta técnica se utilizó para cuantificar la expresión de genes en distintas condiciones de cultivo. Para ello, combina la amplificación de fragmentos de DNA mediante PCR con la medición de la cantidad de DNA a través de la detección de la fluorescencia del agente intercalante SYBR Green, que emite fluorescencia al unirse específicamente al DNA de doble cadena. Se diseñaron oligonucleótidos para cada gen a analizar (listados en la tabla 3 de oligonucleótidos) con el programa Primer Express 2.0, siguiendo los criterios del fabricante del aparato de PCR cuantitativa (Applied Biosystems).

Para las PCR cuantitativas de validación de los resultados de los microarrays (apartado 2.3 de resultados) se usaron los mismos cultivos utilizados para los microarrays, así como la cuantificación de expresión de los genes del contexto de *cbrB*. Para analizar la expresión de los pequeños RNAs se

recogieron cultivos en medio mínimo con L-aa 0,6 mM (fuente de carbono y nitrógeno), citrato 10 mM o succinato 20 mM como fuente de carbono (amonio como fuente de nitrógeno) o LB en fase media exponencial (Abs_{600} 0.4). En todos los casos, se extrajo RNA de cada condición y se retrotranscribió (ver apartados 3.2.12 y 3.4.2). Una vez obtenido, el cDNA se limpió con el kit *QIAquick PCR Purification* (Qiagen) y se cuantificó en un espectrofotómetro *NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer* (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA).

Generalmente se mezclaron en frío 10 ng de cDNA molde, 300 nM de cada oligonucleótido y 12,5 μ L de *Power SYBR® Green PCR Master Mix 2x* (Applied Biosystems) o *SensiFAST™ SYBR Hi-ROX Kit* (Bioline) en un volumen final de 25 μ L para cada reacción. En el caso de la cuantificación de la expresión de los pequeños RNAs CrcZ y CrcY, se usó 1 ng como molde puesto que son de alta expresión y se satura la señal. Como curva patrón de calibración se realizaron 5 diluciones seriadas de DNA cromosómico de *P. putida* KT2442, que sirvieron así de referencia para cuantificar la cantidad relativa de cDNA de un gen presente en cada condición (de 25 a 0,0025 ng). Todas las reacciones se realizaron por cuadruplicado en una placa de 96 pocillos de material óptico (polipropileno). Las reacciones de PCR cuantitativa se realizaron en un termociclador *Abi Prism® 7000 Sequence Detection System* (Applied Biosystems) según las instrucciones del fabricante, siguiendo el siguiente programa:

- a) 2 min a 50 °C.
- b) 10 min a 95 °C (desnaturalización inicial).
- c) 40 ciclos:
 - 15 s a 95 °C (etapa de desnaturalización).
 - 1 min a 60 °C (etapa de apaeamiento y extensión).

d) Subida paulatina de la temperatura desde 60 °C hasta 95 °C: este último paso es un protocolo de disociación del DNA para detectar posibles productos inespecíficos, como serían los dímeros de oligonucleótidos, a través de las temperaturas de desnaturalización (T_m) de los productos presentes en la muestra, calculadas a partir de la curva de disociación obtenida. Si hubiese más de un producto tras la reacción de amplificación aparecería más de una T_m , en cuyo caso se descartarían los oligonucleótidos usados por falta de especificidad.

Para cada gen se hicieron un mínimo de 2 réplicas biológicas (cultivos diferentes) y de cada réplica biológica un mínimo de 2 réplicas técnicas (2 repeticiones). Los datos obtenidos se normalizaron frente a una de las condiciones de ensayo en el caso de validación de microarrays, que denominamos condición control. En los demás casos se compararon los valores absolutos. Posteriormente se calcularon las medias y desviaciones estándar de las de para cada experimento.

3.4.6. Determinación del inicio de transcripción mediante extensión desde el cebador (*Primer extension*).

La determinación del extremo 5' de un transcrito (inicio de transcripción) se llevó a cabo esencialmente como describieron previamente Govantes y col. (Govantes y col., 2000) con algunas modificaciones.

Para cada gen se diseñó un oligonucleótido cebador complementario a la cadena codificante, de 30 nucleótidos y cuya última o dos últimas bases en el extremo 3' fueran C. Este oligonucleótido se marcó radiactivamente en el extremo 5' con $\gamma[^{32}\text{P}]\text{ATP}$ mediante una reacción de fosforilación catalizada por la enzima polinucleótido quinasa de T4 (Roche). Esta reacción se realizó en 10 μL totales, mezclando 5 pmoles del oligonucleótido, 70 μCi de $\gamma[^{32}\text{P}]\text{ATP}$, tres unidades de polinucleótido kinasa de T4 y el tampón que proporciona la firma comercial. Se incubó durante 1 hora a 37 °C y se paró la reacción añadiendo 40 μL de EDTA 25 mM. Para eliminar los nucleótidos y la marca no incorporada se pasó la muestra por una columna de sephadex de *Illustra™ Microspin™ G-25* (GE Healthcare) y tras añadir H_2O hasta 100 mL se fenolizó con fenol:cloroformo 1:1 en un tubo de *Phase Lock Gel™* (Eppendorf o 5PRIME) precompactado. Finalmente se cuantificó la marca en un contador de centelleo.

Las reacciones de extensión del cebador se iniciaron mezclando, de 10 a 30 μg de RNA de cada condición con 300000 cpm de oligonucleótido marcado en un volumen de 50 μL y precipitando con 1/10 de volumen de acetato sódico 3 M pH 5,2 y 2,5 volúmenes de etanol 96 % (v/v) en presencia de 1 μL de glucógeno 20 mg/mL. Tras incubar 30 min a -20 °C y centrifugar a máxima velocidad durante 20 min a 4 °C, se lavó el precipitado con 120 μL de etanol 80 % (v/v), y finalmente se resuspendió en 15 μL de tampón de hibridación (10 mM de Tris-HCl (pH 8,3) y 150 mM de KCl). A continuación se realizaron los pasos de desnaturalización e hibridación en un termociclador. La desnaturalización se realizó durante 5 min a 95 °C y se incubó a temperatura de hibridación (60 °C) durante 90 min. Tras la hibridación a cada muestra se añadieron 15 μL de mezcla de extensión precalentada a 50 °C (90 mM Tris HCl (pH 8,3), 6 mM de MgCl_2 , 2 mM de DTT, 2 mM de dNTPs, 4 U de inhibidor de RNasas (*RNase OUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor*, Invitrogen) y 100 U de la retrotranscriptasa *Superscript III®* (Invitrogen) y se incubó durante 1 h a 50 °C. Después se añadieron 3 μL de EDTA 250 mM y 3,2 μL de NaOH 2 M (preparada en el momento) y se incubó 30 min a 65 °C. Finalizado el programa del termociclador se añadieron 3,2 μL de HCl 2M (preparado en el momento) y se precipitó añadiendo 1 μL de glucógeno 20 mg/mL, 10 μL de acetato sódico 3 M (pH 5,2) y 150 μL de etanol 96 % (v/v). La mezcla se incubó un mínimo de 30 min a -20 °C, se centrifugó a 4°C, se lavó el precipitado y se

resuspendió en 5 µl de solución de carga, que es una mezcla en proporción 3:2 de solución de parada del kit de

secuenciación (formamida 95%, EDTA 20 mM, azul de bromofenol 0,05 % y xylene cyanol 0,05%) y H₂O.

Como marcador de tamaño y para poder localizar el extremo 5' del fragmento retrotranscrito se realizaron reacciones de secuenciación con el mismo oligonucleótido usado para la extensión, usando como molde un fragmento de DNA de doble cadena que incluía la zona del posible inicio de transcripción. Este fragmento fue secuenciado mediante el método de terminación con dideoxinucleótidos utilizando *Thermo SequenaseTM Cycle Sequencing Kit* (USB), siguiendo las instrucciones del fabricante, con los siguientes parámetros para el programa de PCR:

a) Desnaturalización inicial: 5 min a 95 °C

b) 50 ciclos:

30 s a 95 °C

30 s a 60 °C

60 s a 72 °C

Las muestras de secuenciación y de extensión se calentaron durante 2 y 3 min a 75 y 95 °C, respectivamente, para su desnaturalización, y se pusieron inmediatamente en hielo. Se cargaron 2,5-5 µL de cada reacción de secuenciación y las muestras en un gel de secuenciación de TBE/acrilamida 6 % (p/v)-urea 8 M previamente precalentado, hecho a partir de las soluciones premezcladas del kit *SequaGel-6* (National Diagnostics). La electroforesis se realizó en tampón TBE 1x (Tris-ácido bórico 90 mM, EDTA 2 mM, pH 8,3). Tras la carrera, los geles se secaron en un secador *HoeferTM Slab Gel Dryer GD 2000* (GE Healthcare) y se expusieron al menos durante 12 h en una pantalla sensible a radiaciones gamma (*Storage Phosphor Screen*, GE Healthcare). Finalmente la pantalla se escaneó con el escáner *TyphoonTM 9410* (GE Healthcare) para visualizar las bandas obtenidas en la extensión desde cebador junto con las muestras de secuenciación.

3.5. Técnicas de microscopía y análisis de imágenes

Todas las observaciones microscópicas de cultivo en cámara de flujo se realizaron en un microscopio confocal de barrido láser Zeiss LSM510 (CLSM) (Carl Zeiss, Jena, Alemania) equipado con un láser de argón, detector y conjunto de filtros para el seguimiento de la expresión de las proteínas fluorescentes verde (Gfp), cian (Cfp) y amarilla (Yfp) (excitación, 488 nm de emisión, 517 nm). Las imágenes fueron obtenidas utilizando un objetivo de 40 × / 1.3 Plan Neofluar ó 63x y la simulación de

imágenes en tres dimensiones y las secciones fueron generadas mediante el uso del programa Imaris (Bitplane AG, Zurich, Suiza).

Para la detección de flagelo se usó microscopía óptica, de fluorescencia o confocal en función del propósito. Para contar el porcentaje de células flageladas en el silvestre y mutante se tiñó el flagelo, para lo que se usaron colonias de placas de ambas estirpes en LB del día anterior, se tocó sutilmente una colonia con el asa de siembra estéril y se inoculó sobre una gota de agua estéril dispuesta sobre un portaobjetos. Se cubrió con un cubreobjetos. Con carácter previo a la tinción se visualizaron las muestras para comprobar movilidad bacteriana. Se esperó al menos 10 minutos antes de proceder a la tinción, lo que aseguraba que al menos el 50 % de las células pudieran adherirse a la superficie. Entonces se añadieron dos gotas del reactivo en el borde del cubre (*Flagella Stain Droppers*, BD BBL Diagnostic) que contiene 0,6 % cristal violeta en etanol, ácido tánico 2 %, fenol 2.5 % y potasio de aluminio potásico 5,7 %, permitiendo su entrada por capilaridad. Tras 15 minutos de incubación a temperatura ambiente las bacterias se visualizaron con el microscopio *Leica DMI 4000B Inverted* (Leica Microsystems GmbH) con contraste de fases. Con el mismo procedimiento se procesaron las muestras para su visualización con microscopía confocal (*Leica TCS SP2 Spectral confocal system*), con el fin de aumentar la resolución de la imagen para detectar la presencia/ausencia de flagelo entre las estirpes silvestre y mutante MPO406.

Para detectar el componente estructural del flagelo, flagelina, se empleó inmunofluorescencia. Se usaron placas frescas de *P. putida* KT2442, MPO406, *P. aeruginosa* PAO1 en medio LB, de las que se usó una colonia y se fijó en 40 µl de formaldehído 4% en tampón NaCl-P en un portaobjetos durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras lavar con tampón PBT (NaCl-P+0,1% tritón), se bloqueó con suero fetal de ternera en tampón PBT durante 45 minutos y a continuación se incubó con una dilución 1:1000 de Anti-FliC (PAO1, cedido por el Prof. Reuben Rampal) durante otros 45 minutos. Luego se lavó 3 veces con PBT durante 10 minutos y se incubó con anti-IgG (conejo) conjugado con *Alexa Fluor 568*[®] (cabra; fluorescencia roja-naranja) 1:300 durante 90 minutos para la detección. El cromosoma bacteriano se tiñó con el reactivo Hoechst durante 10 minutos antes de la visualización usando un microscopio de fluorescencia *Leica DMI 4000B*.

4. RESULTADOS

4.1. Capítulo 1: Análisis de la regulación del metabolismo del carbono o carbono y nitrógeno por CbrB en *Pseudomonas putida*

La regulación global ejercida por la proteína NtrC sobre el metabolismo del nitrógeno ha sido caracterizada en profundidad tanto en enterobacterias como en el género *Pseudomonas*, donde ejerce un control positivo sobre promotores dependientes del factor σ^N de la RNA polimerasa (Kohler y col., 1989; Reitzer y Schneider, 2001; Reitzer, 2003; Hervas y col., 2008). De forma análoga, se ha descrito el sistema regulador CbrAB, que es exclusivo de las pseudomonas, y que está involucrado en el transporte y/o metabolismo de determinados aminoácidos (Nishijyo y col., 2001).

En este trabajo se ha realizado una caracterización de la utilización de diversos compuestos como fuente de carbono y/o nitrógeno en *P. putida* para tratar de definir el papel regulador del sistema CbrAB y una posible acción coordinada junto al sistema NtrBC en el catabolismo de aminoácidos. Para ello se construyeron unas estirpes mutantes *cbrB*, *ntrC* y *cbrBntrC* y se estudió la capacidad de estas estirpes para utilizar distintos compuestos como fuente de carbono y/o nitrógeno. El mutante *ntrC* (MPO201) se construyó por reemplazamiento alélico del gen *ntrC* por un cassette de kamamicina. El mutante *cbrB* (MPO406) que procedía de una colección de mutantes de *P. putida* (EEZ, Granada) fue el producto de la inserción de un minitransposón (miniTn5luxABKm) en *cbrB*. El doble mutante *cbrBntrC* (MPO400) se construyó mediante el reemplazamiento alélico de *ntrC* sobre el mutante MPO406.

4.1.1. Análisis de la capacidad de utilización de distintos aminoácidos como fuente de carbono, nitrógeno y carbono/nitrógeno por las estirpes KT2442 y los mutantes *cbrB*, *ntrC* y *cbrBntrC*

Se analizó en paralelo el crecimiento de las estirpes *P. putida* KT2442 silvestre y mutante *cbrB* (MPO406) en cultivos de medio mínimo con distintos aminoácidos como única fuente de carbono, nitrógeno o carbono/nitrógeno. Además, el análisis de los mutantes *ntrC* (MPO201) y *cbrBntrC* (MPO400) permitiría identificar si NtrC era un elemento esencial o accesorio en la regulación de la utilización de los distintos aminoácidos como fuentes de carbono, nitrógeno o carbono/nitrógeno. En general, la concentración de los aminoácidos empleada como fuente de carbono y/o nitrógeno fue de 20 mM, salvo en el caso de tirosina que se empleó 5 mM debido a su solubilidad en el medio. Cuando el aminoácido servía solo como fuente de nitrógeno se añadió al medio succinato 20 mM, y si era utilizado como fuente de carbono se añadió amonio 20 mM. Los aminoácidos o elementos nitrogenados ensayados fueron; histidina, arginina, ornitina, tirosina, prolina y glutamato.

La histidina es un aminoácido con un grupo imidazol que contiene 6 átomos de carbono y 3 de nitrógeno por molécula, y la arginina contiene 6 átomos de carbono y 4 de nitrógeno. Se han descrito hasta 4 rutas de utilización/síntesis de arginina en bacterias, aunque la ruta AST es la más utilizada. La ornitina es un aminoácido que contiene 5 átomos de carbono y 2 de nitrógeno y forma parte del ciclo de la urea y constituye un punto de partida para la síntesis de poliaminas como la putrescina. La tirosina es un aminoácido aromático que contiene 9 átomos de carbono y un único átomo de nitrógeno. La prolina contiene 5 átomos de carbono y 1 un único átomo de nitrógeno. Las rutas metabólicas de histidina, ornitina y prolina convergen en glutamato, mientras que las de arginina, ornitina y tirosina se incorporan al ciclo de Krebs a través de fumarato (ver figura 5). El glutamato a su vez puede ser metabolizado a través de dos vías: incorporándose al Ciclo de Krebs al transformarse en 2-oxoglutarato o bien transformándose en glutamina, gracias a la actividad glutamina sintetasa y accediendo así al ciclo del nitrógeno.

4.1.1.1. Utilización de histidina

El análisis del crecimiento de la estirpe silvestre y las estirpes mutantes *cbrB*, *ntrC* y *cbrBntrC* en un medio mínimo con histidina mostró que cuando ésta se utilizaba como fuente de nitrógeno, las cuatro estirpes tenían una tasa de crecimiento similar. Solamente el doble mutante mostró una fase de latencia algo más larga (5 horas) (Figura 9A). Cuando la histidina constituía la única fuente de carbono pero tenía fuente adicional de nitrógeno, el mutante *cbrB* y el doble mutante fueron incapaces de crecer durante las primeras 18 h (Figura 9C), mientras que la estirpe silvestre y el mutante *ntrC* crecieron normalmente. El crecimiento observado tras incubación prolongada podría deberse a la aparición de supresores del crecimiento por presión metabólica. Este fenómeno indica que en estas condiciones CbrB es necesario para metabolizar la histidina. Sin embargo, cuando la histidina se encontraba en el medio como única fuente de carbono y nitrógeno, las estirpes silvestre y los dos mutantes simples fueron capaces de crecer a expensas de ella, mientras que el doble mutante *cbrBntrC* no pudo utilizarla. Estos datos sugieren que CbrB regula de alguna forma la utilización de histidina como fuente de carbono, pero cuando existe una limitación en nitrógeno, el sistema regulador Ntr podría suplir parcialmente su función.

Un aspecto interesante que se debe destacar es que el mutante *ntrC* creció más eficientemente que la estirpe silvestre utilizando histidina como única fuente de C (Fig. 9C), lo que indica que NtrC podría interferir con el proceso de activación mediado por CbrB. De nuevo, cuando utiliza histidina como fuente de carbono y nitrógeno, observamos un crecimiento más eficiente de los mutantes simples *cbrB* o *ntrC*, que el de la estirpe silvestre (Figura 9B).

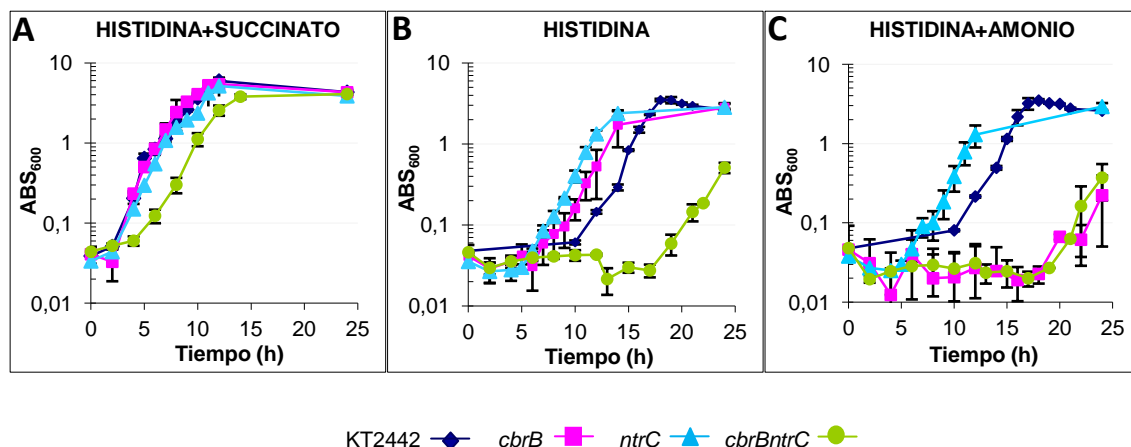


Figura 9. Crecimiento de *P. putida* KT2442 y mutantes *cbrB* (MPO406), *ntrC* (MPO201) y *cbrBntrC* (MPO400) en un medio definido utilizando histidina como fuente de nitrógeno (A), carbono (B) y carbono y nitrógeno (C). El crecimiento fue medido como aumento de la densidad óptica a 600 nm (ABS₆₀₀) a lo largo del tiempo. Los símbolos representan: rombo azul, KT2442; cuadrado rosa, *cbrB*; triángulo turquesa, *ntrC* y círculo verde, *cbrBntrC*.

4.1.1.2. Utilización de arginina

En la Figura 10 se resume el crecimiento en arginina como única fuente de nitrógeno (A), carbono (B) o carbono y nitrógeno (C) en los mutantes *ntrC*, *cbrB* y *cbrBntrC* de *P. putida*. Las cuatro estirpes crecieron eficientemente a expensas de la arginina como fuente de nitrógeno (Figura 10A). Sin embargo, cuando fue empleada como fuente de carbono, ni el mutante *cbrB* ni el doble mutante fueron capaces de usarla para sustentar el crecimiento (Figura 10B). El mismo efecto se observó al emplear la arginina como fuente de carbono y nitrógeno (Figura 10C), lo que apunta a un control por parte de CbrB en la asimilación de este aminoácido como fuente de carbono o carbono y nitrógeno. El mutante *ntrC* creció eficientemente en todas las condiciones analizadas, por lo que el sistema Ntr no parece estar implicado en la asimilación de arginina.

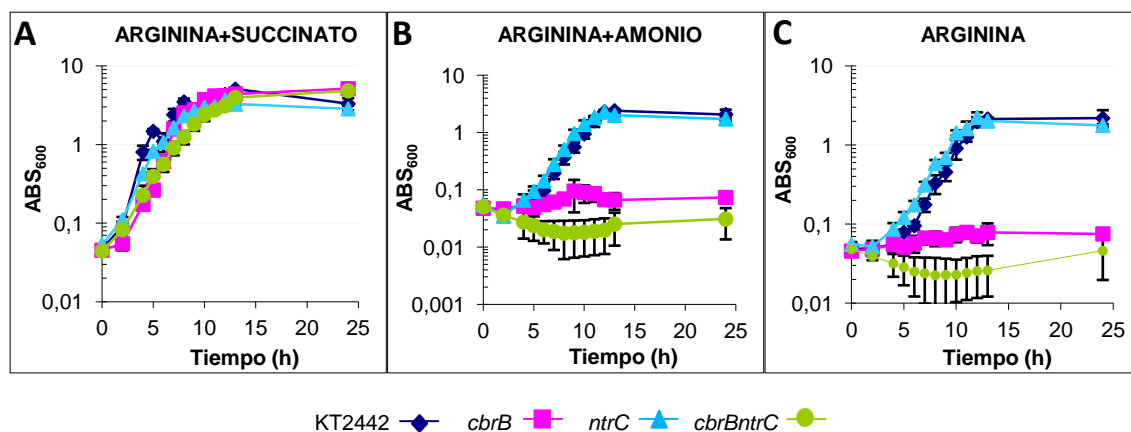


Figura 10. Crecimiento de *P. putida* KT2442 y mutantes *cbrB* (MPO406), *ntrC* (MPO201) y *cbrBntrC* (MPO400) en un medio definido utilizando arginina como fuente de nitrógeno (A), carbono (B) y carbono y nitrógeno (C). El crecimiento fue medido como aumento de la densidad óptica a 600 nm (ABS_{600}) a lo largo del tiempo. Los símbolos representan: rombo azul, KT2442; cuadrado rosa, *cbrB*; triangulo turquesa, *ntrC* y círculo verde, *cbrBntrC*.

4.1.1.3. Utilización de Ornitina

Aunque la ornitina es un intermediario del catabolismo de arginina, y por lo tanto era previsible una regulación común a la asimilación de arginina, se comprobó que existían algunas diferencias. La ornitina resultó ser una buena fuente de nitrógeno para la estirpe silvestre y para el mutante *cbrB* (Figura 11A), pero sin embargo, los mutantes *ntrC* y doble mutante vieron aumentada la fase de latencia. Cuando la ornitina se utilizó como fuente de carbono, las cuatro estirpes vieron limitado su crecimiento en mayor o menor medida (Figura 11B), y los mutantes *cbrB* y *cbrBntrC* no crecieron en este medio. Este mismo efecto se observó cuando la ornitina se utilizó como fuente de carbono y nitrógeno, lo que indicaba que era la asimilación como fuente de carbono lo que limitaba el crecimiento en los fondos genéticos mutantes (Figura 11C).

La integración de los datos obtenidos en ornitina sugiere que CbrB es esencial para la utilización de ornitina como fuente de carbono y que NtrC participa en su utilización como fuente de nitrógeno.

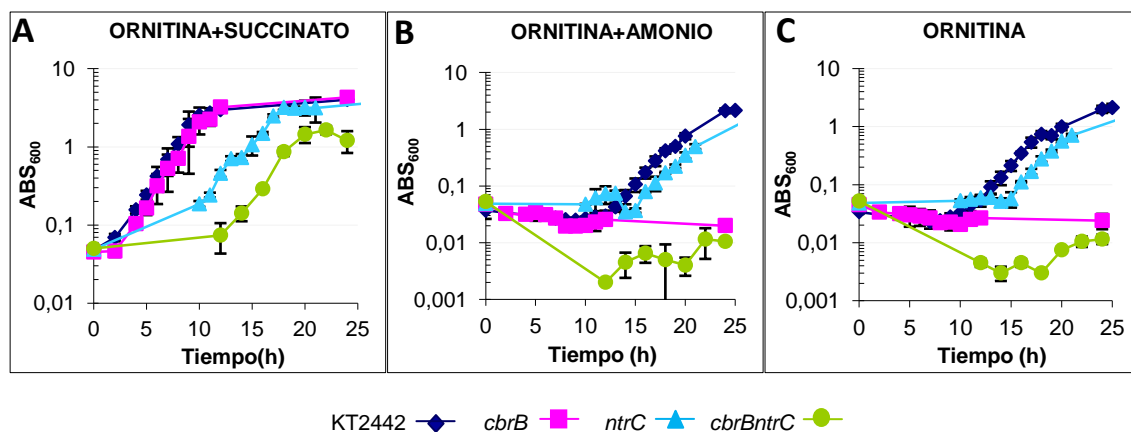


Figura 11. Crecimiento de *P. putida* KT2442 y mutantes *cbrB* (MPO406), *ntrC* (MPO201) y *cbrB ntrC* (MPO400) en un medio definido utilizando ornitina como fuente de nitrógeno (A), carbono (B) y carbono y nitrógeno (C). El crecimiento fue medido como aumento de la densidad óptica a 600 nm (ABS_{600}) a lo largo del tiempo. Los símbolos representan: rombo azul, KT2442; cuadrado rosa, *cbrB*; triangulo turquesa, *ntrC* y círculo verde, *cbrBntrC*.

4.1.1.4. Utilización de Tirosina

La tirosina se utilizó a una concentración de 5 mM en los medios de cultivo, debido a su baja solubilidad. Esta concentración de tirosina permitió a la estirpe silvestre alcanzar una densidad óptica (A_{600}) de alrededor de 1 cuando se usaba como fuente de carbono (Figura 12B) o como carbono y nitrógeno (Figura 12C), y alcanzaba una A_{600} de 2 si se utilizaba como fuente de nitrógeno. Cuando la tirosina se utilizaba como fuente de nitrógeno, la tasa de crecimiento para las estirpes mutantes se vio disminuída respecto al silvestre (Figura 12A). Cuando se utilizaba como fuente de carbono, el mutante *cbrB* y el doble *cbrBntrC* no crecieron, mientras que el mutante *ntrC* creció como el silvestre en estas condiciones en las que el sistema Ntr se encuentra inactivo a causa de las condiciones de exceso de nitrógeno (Figura 12B). El efecto sobre el crecimiento en las cuatro estirpes fue el mismo cuando la tirosina se utilizó como fuente de carbono y nitrógeno (Figura 12C). Estos datos sugieren que CbrB es esencial para utilizar tirosina como fuente de carbono y que NtrC puede facilitar la utilización de tirosina como fuente de nitrógeno. En el primer paso de la asimilación de tirosina se libera una molécula de amonio y es posible que los sucesivos pasos vayan dirigidos a su utilización como fuente de carbono, que serán los que probablemente estén controlados por CbrB.

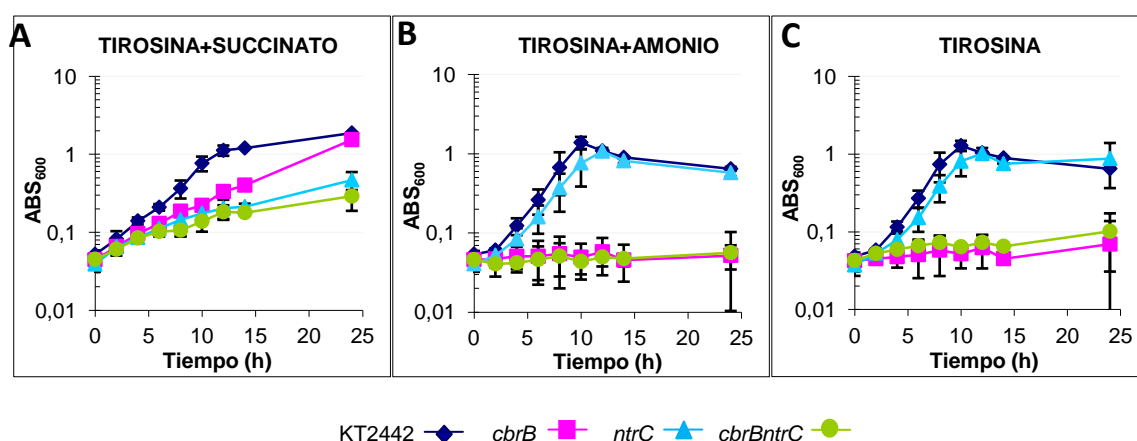


Figura 12. Crecimiento de *P. putida* KT2442 y mutantes *cbrB* (MPO406), *ntrC* (MPO201) y *cbrB ntrC* (MPO400) en un medio definido utilizando tirosina como fuente de nitrógeno (A), carbono (B) y carbono y nitrógeno (C). El crecimiento fue medido como aumento de la densidad óptica a 600 nm (ABS_{600}) a lo largo del tiempo. Los símbolos representan: rombo azul, KT2442; cuadrado rosa, *cbrB*; triangulo turquesa, *ntrC* y círculo verde, *cbrBntrC*.

4.1.1.5. Utilización de Prolina

El crecimiento de la estirpe silvestre en prolina reveló que este aminoácido es muy buena fuente de carbono y también de nitrógeno (Figura 13), con tasas de crecimiento similares a un medio que contiene succinato+amonio (ver apartado 1.2.). La prolina resultó ser tambien una buena fuente de nitrógeno para las estirpes *cbrB* y *ntrC*, aunque el mutante *cbrBntrC* vió retrasado su crecimiento

en estas condiciones (Figura 13A). Cuando la prolina se usó como fuente de carbono, el mutante *cbrB* se vio claramente afectado en su crecimiento, y el efecto fue todavía más drástico para el doble mutante (Figura 13B). La utilización de prolina como fuente de carbono y nitrógeno fue igual que cuando se usaba como fuente de carbono (Figura 13C). Los datos muestran que CbrB participa en la asimilación de prolina como fuente de carbono, y que NtrC puede suplir parcialmente su función, como se desprende de la comparación entre el mutante *cbrB* y el doble mutante *cbrBntrC*. Sin embargo, la utilización de prolina como fuente de nitrógeno es principalmente independiente de ambos sistemas reguladores.

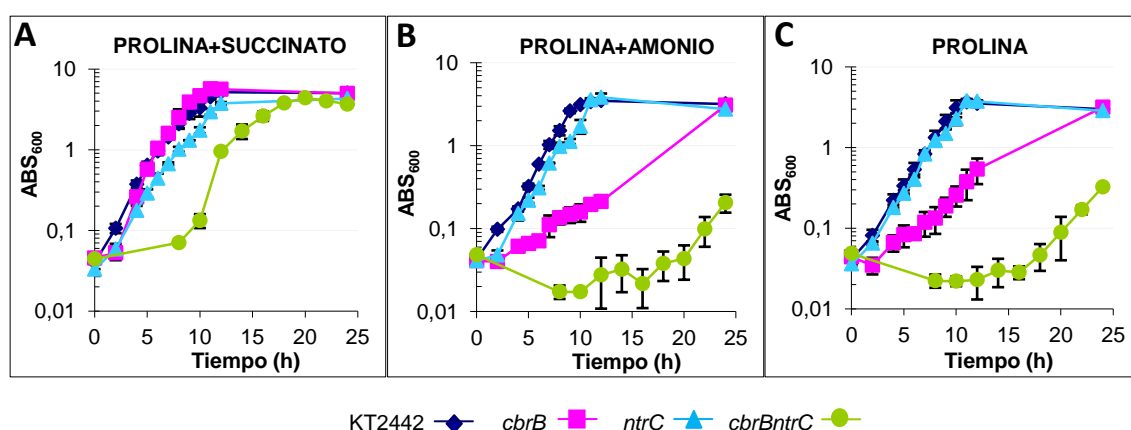


Figura 13. Crecimiento de *P. putida* KT2442 y mutantes *cbrB* (MPO406), *ntrC* (MPO201) y *cbrBntrC* (MPO400) en un medio definido utilizando prolina como fuente de nitrógeno (A), carbono (B) y carbono y nitrógeno (C). El crecimiento fue medido como aumento de la densidad óptica a 600 nm (ABS₆₀₀ nm) a lo largo del tiempo. Los símbolos representan: rombo azul, KT2442; cuadrado rosa, *cbrB*; triangulo turquesa, *ntrC* y círculo verde, *cbrBntrC*.

4.1.1.6. Utilización de Glutamato

El glutamato es un aminoácido en el que convergen varias rutas en el catabolismo de aminoácidos (histidina, prolina, arginina, glutamina) (Figura 5). El análisis del crecimiento en glutamato mostró que la estirpe silvestre y el mutante *cbrB* lo utilizaban eficientemente como fuente de nitrógeno, pero no así los mutantes *ntrC* y *cbrBntrC* (Figura 6A). Esto indicaba la participación del sistema Ntr en su utilización como fuente de nitrógeno. Sin embargo, cuando el glutamato se usaba como fuente de carbono o de carbono y nitrógeno, ninguna de las mutaciones afectó significativamente el crecimiento (Figura 14B y C). CbrB no parece por tanto implicado en la asimilación de glutamato como fuente de carbono o nitrógeno.

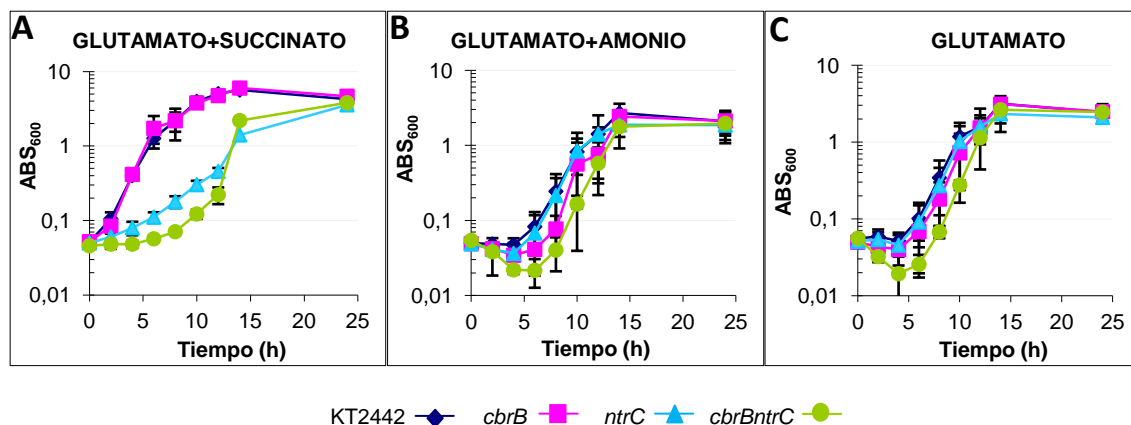


Figura 14. Crecimiento de *P. putida* KT2442 y mutantes *cbrB* (MPO406), *ntrC* (MPO201) y *cbrBntrC* (MPO400) en un medio definido utilizando glutamato como fuente nitrógeno (A), carbono (B) y carbono y nitrógeno (C). El crecimiento fue medido como aumento de la densidad óptica a 600 nm (ABS₆₀₀) a lo largo del tiempo. Los símbolos representan: rombo azul, KT2442; cuadrado rosa, *cbrB*; triángulo turquesa, *ntrC* y círculo verde, *cbrBntrC*.

4.1.2. Caracterización fenotípica de la utilización de otras fuentes de carbono por *Pseudomonas putida*

Hemos descrito el papel del sistema CbrAB en la regulación de la asimilación y/o transporte de distintos aminoácidos, como fuente de carbono o carbono/nitrógeno, sin embargo no podía descartarse que este sistema estuviera implicado también en la regulación de otros compuestos carbonados. Por ello se analizó el crecimiento en varios compuestos intermediarios del ciclo de Krebs, concretamente succinato y citrato, compuestos que sólo podían constituir una fuente de carbono y energía para *P. putida*.

El citrato es un ácido tricarbolíco de 6 átomos de carbono, que forma parte del ciclo de Krebs. La doble descarbolización de la molécula genera poder reductor para generar succinato, que tiene 4 átomos de carbono. Se analizó el posible papel regulador de CbrB en el metabolismo del carbono a este nivel, estudiando el crecimiento de una estirpe de *P. putida* silvestre y mutante *cbrB* en un medio mínimo que contenía estos compuestos como única fuente de carbono.

4.1.2.1. Crecimiento en citrato y en succinato como fuente de carbono

Se analizó el crecimiento de la estirpe silvestre y el mutante *cbrB* en medio mínimo usando citrato 10 mM o succinato 20 mM como única fuente de carbono (Figura 15). La estirpe silvestre mostró un crecimiento muy eficiente utilizando tanto el citrato como el succinato. Sin embargo, el mutante *cbrB* creció como la estirpe silvestre utilizando succinato, pero no era capaz de crecer usando citrato como fuente de carbono. El doble mutante *cbrBntrC* mostró el mismo fenotipo que el mutante simple. El crecimiento de estas estirpes transcurridas 24 horas puede ser atribuida a la

aparición de supresores. Dado que el mutante *ntrC* creció como el silvestre en citrato y succinato (Figura 15A), la falta de crecimiento en el doble mutante debe ser causada por la mutación *cbrB*. El crecimiento en succinato por parte de las cuatro estirpes fue igualmente eficiente, y solamente la estirpe *cbrB* mostró una fase de latencia un poco retrasada (2 horas) (Figura 15B). El análisis del crecimiento en succinato y citrato parece indicar que el sistema Cbr podría ejercer un control sobre alguno de las reacciones implicadas en el ciclo de Krebs, o bien sobre el transporte de fuentes de carbono.

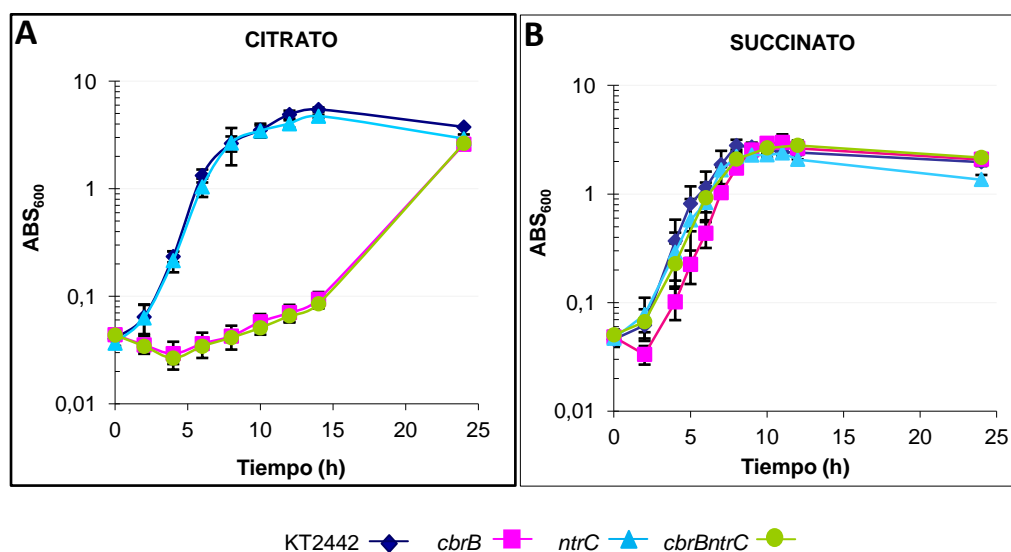


Figura 15. Crecimiento de *P. putida* KT2442 y mutantes *cbrB* (MPO406), *ntrB* (MPO201) y *cbrB ntrC* (MPO400) en un medio definido con citrato (A) y succinato (B) como fuente de carbono. El crecimiento fue medido como aumento de la densidad óptica a 600 nm (ABS₆₀₀ nm) a lo largo del tiempo. Los símbolos representan: rombo azul, KT2442; cuadrado rosa, *cbrB*; triangulo turquesa, *ntrC* y círculo verde, *cbrB ntrC*.

4.1.2.2. Análisis fenotípico de *Pseudomonas putida* mediante *Phenotype microarrays*

Con el fin de obtener una perspectiva del efecto de una mutación en *cbrB* sobre el mapa metabólico completo de *P. putida* se llevó a cabo un análisis fenotípico mediante los denominados Phenotype Microarrays de Biolog inc. (Bochner, 1989). Esta aproximación permite analizar la actividad metabólica de distintas estirpes al utilizar distintos compuestos como fuente de carbono o nitrógeno. Para ello, se cuantifica una actividad cromogénica en función del potencial metabólico de la bacteria en el medio analizado. Se utilizaron placas de 96 pocillos que contenían diversas fuentes de carbono (placas PM1 y PM2) o nitrógeno (PM3, PM6 y PM7) como fuente de carbono y energía. En la tabla 6 se muestran los resultados de este análisis para la estirpe silvestre y el mutante *cbrB*. Los datos crudos completos se encuentran en la tabla S6 y la figura S1 del Anexo.

PM1-2 Fuentes de Carbono		
Compuesto	Score	Placa
Etanolamina	134	PM01
Ácido 5-oxo-D-Glucónico	114	PM02
Ácido glutámico	78	PM01
Ácido butírico	77	PM02
L-Leucina	75	PM02
Ácido γ -Amino-butírico	74	PM02
Ácido α -oxoaléico	67	PM02
D-Ribono-1,4-Lactona	60	PM02
Ácido D-glucurónico	59	PM01
PM3,6 y 7 Fuentes de Nitrógeno		
Compuesto	Score	Placa
Tyr-Gln	106	PM07
Tyr-Glu	104	PM07
Tyr-Gly	99	PM07
Tyr-His	91	PM07
Tyr-Ala	90	PM07
Arg-Tyr	83	PM06
Lys-Tyr	80	PM07
Val-Tyr	76	PM07
Glu-Tyr	76	PM06
Ácido úrico	75	PM03
Ser-Tyr	72	PM07
Val-Arg	71	PM07
Trp-Arg	71	PM07
L-Glutamina	70	PM06
Lys-Lys	63	PM07
Ala-Tyr	63	PM06
Leu-Arg	61	PM06
Tyr-Val	60	PM08
Tyr-Phe	60	PM07
Tyr-Leu	60	PM07
Ala-Glu	59	PM03
Leu-Glu	59	PM06
Arg-Phe	58	PM06
Ala-Glu	58	PM06
Glu-Val	57	PM06
Ala-Arg	57	PM06
Val-Asn	55	PM07
Ácido α -Amino-N-Valérico	54	PM03
Asp-Lys	54	PM06
L-Fenilalanina	53	PM03
Tyr-Lys	53	PM07
Ala-His	52	PM03
Ala-His	52	PM06
Met-Phe	52	PM07
Ile-Phe	52	PM06

Tabla 6. Resultados del estudio fenotípico mediante el Biolog *Phenotypic Microarray*. Se representó la actividad redox para las estirpes *P. putida* KT2442 silvestre y el mutante *cbrB* (MPO406) durante 24 horas. Las placas PM01 and PM02 contenían 96 fuentes de carbono y las placas PM03, PM06 y PM07 contenían distintas fuentes de nitrógeno. La actividad metabólica se expresó como *score*, que representa la diferencia de áreas bajo las curvas de actividad metabólica para ambas estirpes. En la tabla se muestran valores de *score* >52 como cambio significativo. Las curvas de actividad metabólica se muestran en la Figura S1 del Anexo.

De este estudio se observó que existían 9 fuentes de carbono en las que las estirpes analizadas presentaban una actividad metabólica diferencial. En concreto, el mutante *cbrB* estaba afectado en la asimilación de etanolamina, lípidos y de glicerofosfolípidos (KEGG); ácido γ -aminobutírico, intermediarios del metabolismo de alanina, aspartato, glutamato, arginina y prolina vía putrescina; ácido 2-oxovalérico, implicado en la biosíntesis de valina, leucina e isoleucina, y el ácido D-glucurónico, que es un producto de las interconversiones entre pentosas y glucoronato de la ruta de las pentosas-fosfato.

En las placas con distintos compuestos como fuente de nitrógeno, el mutante *cbrB* presentó menor actividad metabólica que la estirpe silvestre cuando se encontraba en un medio que contenía hasta 35 compuestos distintos como fuente de nitrógeno, siendo la mayoría de ellos dipéptidos. Además, de ellos, 16 eran dipéptidos que contenían tirosina, lo que concuerda con el defecto de crecimiento en tirosina descrito para el mutante *cbrB* y *cbrB ntrC* el apartado 4.1.1.4. Las otras fuentes de nitrógeno cuya utilización estaba afectada en el mutante *cbrB* fueron ácido úrico, L-Glutamina, ácido α -Amino-N-Valérico, L-Fenilalanina.

4.1.3. Búsqueda de condiciones de inducción global para el sistema Cbr

A diferencia de otros sistemas de dos componentes como el sistema NtrBC, la señal a la que responde el sistema CbrAB no ha sido caracterizada hasta la fecha. Datos previos en *P. aeruginosa* indican que podría estar relacionada con el equilibrio C/N (Nishijyo y col., 2001). Nuestros datos de crecimiento utilizando distintos aminoácidos como fuente de C o C/N por parte de las estirpes silvestre y mutante *cbrB* muestran diferencias en la utilización de diversos aminoácidos. Con el objeto de realizar un análisis del patrón de expresión global, se procedió a buscar unas condiciones en las que se produjese una inducción máxima del sistema Cbr, reflejado como una diferencia en el crecimiento entre las estirpes silvestre y mutante *cbrB* en un medio definido. Es necesario destacar, que las rutas catabólicas de la mayoría de los aminoácidos están sujetas a una inducción específica y es necesaria la presencia del sustrato para que la expresión de la ruta se encuentre activa. Por ello, la búsqueda de condiciones de inducción del sistema Cbr, implicaba el uso de un medio rico que

garantizase la inducción de al menos todas las rutas de asimilación de aminoácidos en las que se habían detectado un crecimiento diferencial entre ambas estirpes.

4.1.3.1. Crecimiento en medio completo LB o LB diluido

En primer lugar se analizó el crecimiento de *P. putida* KT2442 silvestre y los mutantes *cbrB*, *ntrC* y *cbrBntrC* en un medio LB a lo largo del tiempo (Figura 16A). La estirpe silvestre y los mutantes *cbrB* y *ntrC* mostraron una tasa de crecimiento similar en el medio completo LB. Sin embargo, el doble mutante *cbrBntrC* mostró un crecimiento diáuxico, con dos etapas bien definidas. En la primera etapa se observaba el crecimiento de la estirpe hasta una densidad óptica de 0,3 durante las primeras dos horas, y una segunda etapa hasta alcanzar la fase estacionaria. Estos datos sugerían una deficiencia en la asimilación/transporte de algunos aminoácidos en el doble mutante *cbrBntrC*, en comparación con la estirpe silvestre.

Con el objeto de buscar diferencias más evidentes en el crecimiento entre las estirpes silvestre y mutante *cbrB*, se estudió su crecimiento en un medio LB diluido 4, 8 ó 12 veces (en medio tamponado) para limitar la concentración de fuente de carbono. Aunque el crecimiento de ambas estirpes se vió limitado al diluir el medio, no se observaron diferencias considerables en el crecimiento entre ambas estirpes (Figura 16B). Por esta razón se procedió a analizar otros medios en los que las diferencia en el crecimiento entre las estirpes silvestre y mutante *cbrB* fuesen más evidentes.

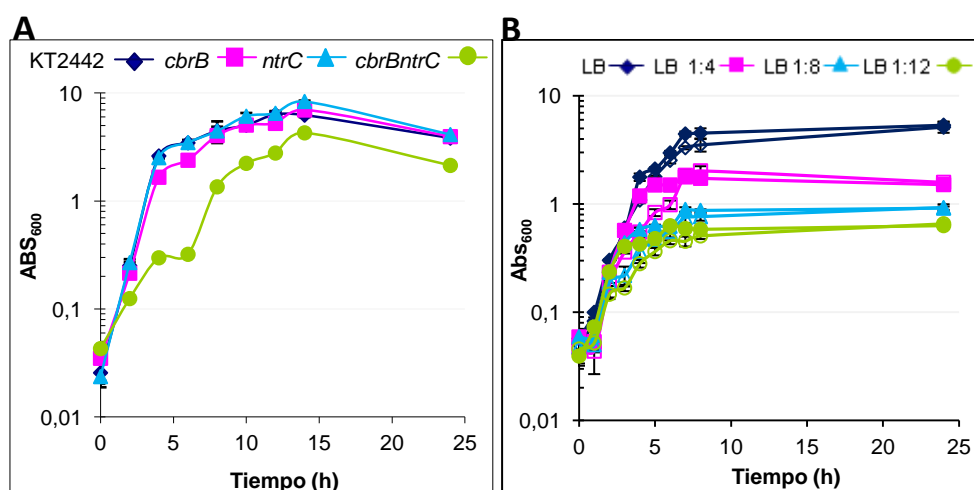


Figura 16. Crecimiento de *P. putida* KT2442 y mutantes *cbrB*, *ntrC* y *cbrB ntrC* en un medio LB y LB diluido. Curvas de crecimiento, medido como aumento de la densidad óptica a 600 nm (Abs₆₀₀ nm) del cultivo en función del tiempo, en medio LB (panel A) LB diluido (panel B). **A.** Crecimiento en medio LB, los símbolos representan: rombo azul, KT2442; cuadrado rosa, *cbrB* (MPO406); triángulo turquesa, *ntrC* (MPO201); círculo verde, *cbrB ntrB* (MPO400). **B.** Crecimiento en medio LB diluido. Los símbolos cerrados representan a la estirpe

silvestre y los abiertos a *cbrB* (MPO406) en medio LB (azul) o LB diluido 1/4 (rosa), 1/8 (turquesa) y 1/12 (verde).

4.1.3.2. Crecimiento en medio mínimo con casaminoácidos

Se analizó el crecimiento de las estirpes silvestre y mutante *cbrB* en un medio definido con casaminoácidos como fuente de carbono y nitrógeno. Los casaminoácidos son un hidrolizado ácido de la caseína donde existe una mezcla de aminoácidos y algunos pequeños péptidos. Este medio proporciona todos los aminoácidos esenciales para el crecimiento, salvo triptófano que resulta completamente degradado ante una digestión ácida (Mueller y Johnson, 1941), y constituye una fuente de múltiples compuestos carbonados para la célula. Con el objeto de encontrar un medio que mostrase un crecimiento diferencial entre las estirpes silvestre y el mutante *cbrB*, se analizó el crecimiento de las estirpes en un medio definido que contenía cinco concentraciones diferentes de casaminoácidos (20, 10, 5, 2,5 y 1 mM) como fuente de carbono y nitrógeno (Figura 17).

Como era de esperar, el rendimiento de los cultivos se redujo proporcionalmente a la concentración de casaminoácidos empleada. Las mayores diferencias en el crecimiento entre ambas estirpes se observaron a concentraciones intermedias de casaminoácidos (entre 2,5 y 10 mM). El mutante *cbrB* presentó un crecimiento diaúxico a concentraciones de casaminoácidos bajas, lo que podría indicar un periodo necesario de adaptación ante una cambiante jerarquía de utilización de aminoácidos. El rendimiento del cultivo en el mutante *cbrB* resultó ser siempre ligeramente inferior al de la estirpe silvestre (Figura 17).

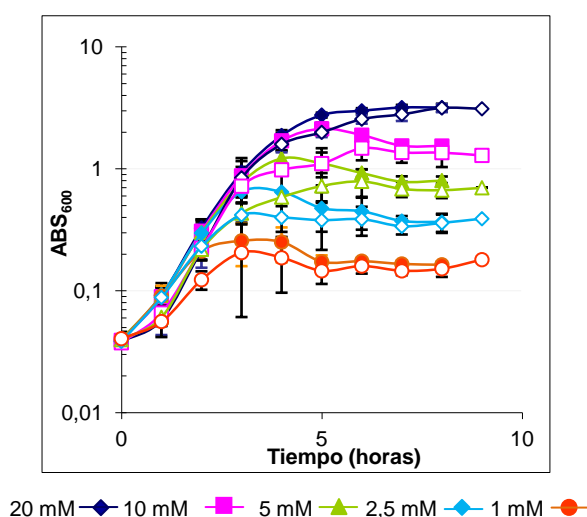


Figura 17. Crecimiento de *P. putida* y mutante *cbrB* (MPO406) en un medio definido con casaminoácidos como fuente de C y N. Curvas de crecimiento medido como aumento de la densidad óptica del cultivo a 600 nm (ABS_{600}) en función del tiempo, para *P. putida* KT2442 (símbolo cerrado) y mutante *cbrB*, MPO406 (símbolo abierto) en un medio mínimo con casaminoácidos como única fuente de carbono y nitrógeno a 20 (azul), 10 (rosa), 5 (verde), 2,5 (turquesa) y 1 mM (naranja).

4.1.3.3. Crecimiento en L-aminoácidos

Se estudió el crecimiento de las estirpes silvestre y mutante *cbrB* en un medio definido que contenía una mezcla de los 21 aminoácidos (incluyendo ornitina) a una concentración definida. La ventaja de este medio frente al hidrolizado de caseína era que se podía estimar y controlar la concentración de todos los aminoácidos (incluido el triptófano) y así poder establecer las condiciones de limitación de carbono y/o nitrógeno. Se probaron distintas concentraciones de aminoácidos para definir la que permitiera el crecimiento del mutante *cbrB*, pero que además supusiera limitación de carbono (ver apartado 1.5.2). Se monitorizó el crecimiento de las estirpes silvestre y mutante *cbrB* en un medio que contenía concentraciones crecientes de L-aminoácidos (5, 2,5, 1,25 y 0,6 mM) (Figura 18). Las mayores diferencias en el crecimiento entre ambas estirpes se observaron a una concentración de cada uno de los L-aminoácidos de 0,6 mM durante las 7 primeras horas de cultivo a 30 °C. Estas condiciones suponían una concentración total de carbono y nitrógeno de 12,6 mM, suficiente para alcanzar alrededor de 2 unidades de densidad óptica.

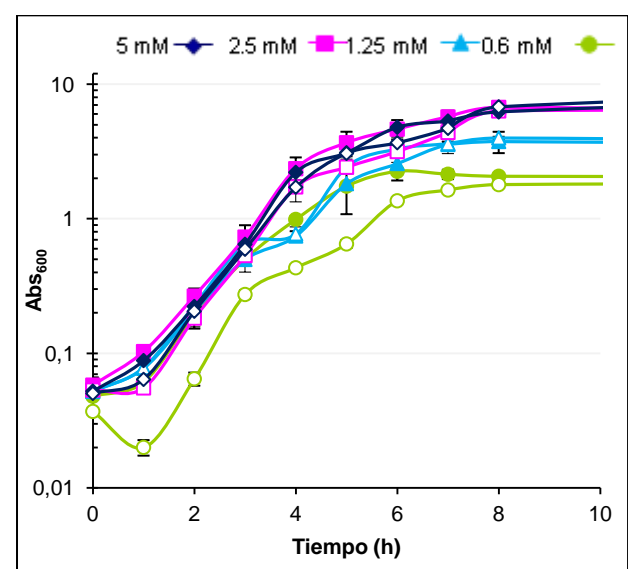


Figura 18. Crecimiento de *P. putida* KT2442 y mutante *cbrB* (MPO406) en un medio definido con L-aminoácidos como fuente de carbono y nitrógeno. Curvas de crecimiento, medido como aumento de la densidad óptica a 600 nm (ABS_{600}) del cultivo en función del tiempo para *P. putida* KT2442 (símbolo cerrado), mutante *cbrB* (símbolo abierto), en medio mínimo con L-aminoácidos 5 mM, 2,5 mM, 1,25 mM y 0,6 mM de cada uno.

En estudios posteriores de expresión se utilizó siempre un medio definido con una mezcla de L-aminoácidos a 0,6 mM, y en condiciones de crecimiento exponencial del cultivo. *P. putida* utiliza esta mezcla de L-aminoácidos 0,6 mM como fuente de carbono con una gran eficiencia, y es el medio en el que crece con una mayor tasa de crecimiento. Además, en la figura 21 se muestra el crecimiento de la estirpe silvestre en un medio mínimo que contiene distintos compuestos como fuente de carbono, y se observa que el crecimiento más rápido se observa en un medio con la mezcla

de L-aa 0,6 mM, siendo la siguiente fuente de carbono más fácilmente asimilable el succinato, citrato, prolina, tirosina, arginina, glutámico, histidina y ornitina en último lugar.

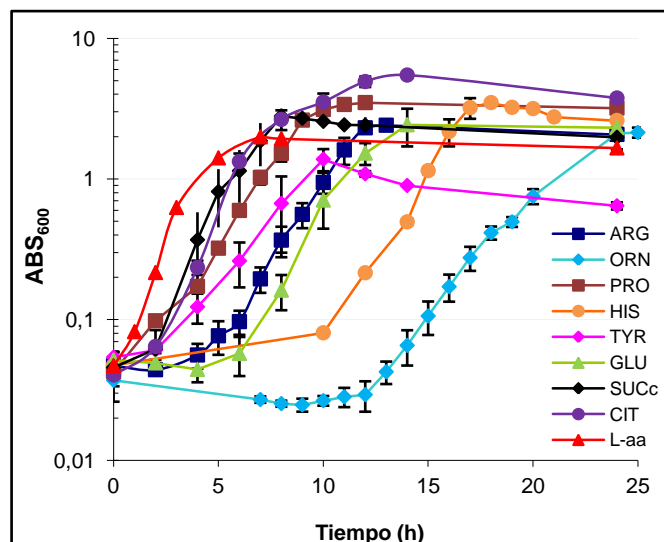


Figura 19. Crecimiento de *P. putida* en un medio mínimo con distintas fuentes de carbono. Curvas de crecimiento, medido como aumento de la densidad óptica a 600 nm (A_{600} nm) del cultivo en función del tiempo para *P. putida* KT2442. Se creció en medio mínimo con Arginina 20 mM (ARG), Ornitina 20 mM (ORN), Prolina 20 mM (PRO), Histidina 20 mM (HIS), Tirosina 5 mM (TYR), Glutamato 20 mM (GLU), Succinato 20 mM (SUCC), Citrato 10 mM (CIT) como fuentes de carbono y amonio como fuente de nitrógeno. Por último, L-aminoácidos (L-aa) como fuente de carbono y nitrógeno.

4.2. Capítulo 2: Análisis de la regulación ejercida por el regulador transcripcional CbrB en *Pseudomonas putida*

En el capítulo anterior se ha descrito la asimilación de numerosos compuestos como fuente de carbono por *P. putida*, con el fin de definir unas condiciones experimentales que garanticen en la medida de lo posible la activación por CbrB, a la vez que permitan el crecimiento del mutante *cbrB*.

4.2.1. Estudio del patrón global de expresión mediado por CbrB: análisis transcriptómico mediante *microarrays* de DNA

Una vez definidas las condiciones experimentales, se procedió a caracterizar el patrón de expresión global en las estirpes silvestre y mutante *cbrB* (MPO406). Con el objeto de identificar el posible efecto del sistema Ntr en la asimilación de distintos aminoácidos, se realizó una segunda aproximación transcriptómica en la que se estudiaron las diferencias en el patrón de expresión entre las estirpes mutante *ntrC* (MPO201) y *cbrBntrC* (MPO400). La comparación del patrón de la expresión

global en las dos aproximaciones permitiría distinguir la regulación ejercida por el sistema regulador Cbr de la ejercida por el sistema regulador Ntr.

Para los experimentos de *microarrays* se recogieron células de los correspondientes cultivos en fase exponencial media tras una inducción corta de dos horas en un medio definido que contenía L-aminoácidos a una concentración de 0,6 mM cada uno (12,6 mM final). A continuación se extrajo RNA y se sintetizó cDNA según se detalla en materiales y métodos (apartado 3.4.4). Los resultados de los correspondientes análisis se detallan a continuación.

4.2.1.1. Análisis comparativo del patrón de expresión de la estirpe silvestre KT2442 y el mutante *cbrB* (MPO406).

Con el objeto de estudiar el papel que ejerce CbrB sobre el conjunto de los genes de *P. putida*, se comparó el patrón de expresión de la estirpe silvestre con el de la estirpe mutante *cbrB*. En la Figura 20 se representan los genes expresados diferencialmente conforme a los criterios seleccionados (ver materiales y métodos 3.4.4) ordenados en categorías funcionales según la clasificación de la página web “Comprehensive Microbial Resource” (Peterson y col., 2001). Se detectó una expresión diferencial de 91 genes, de los cuales 40 tenían una expresión más alta en el mutante *cbrB* y 51 genes tenían una expresión más alta en la estirpe silvestre.

Los datos numéricos de todos los parámetros que describen el comportamiento de cada gen de *P. putida* en cada condición se presentan en la tabla S1 del anexo.

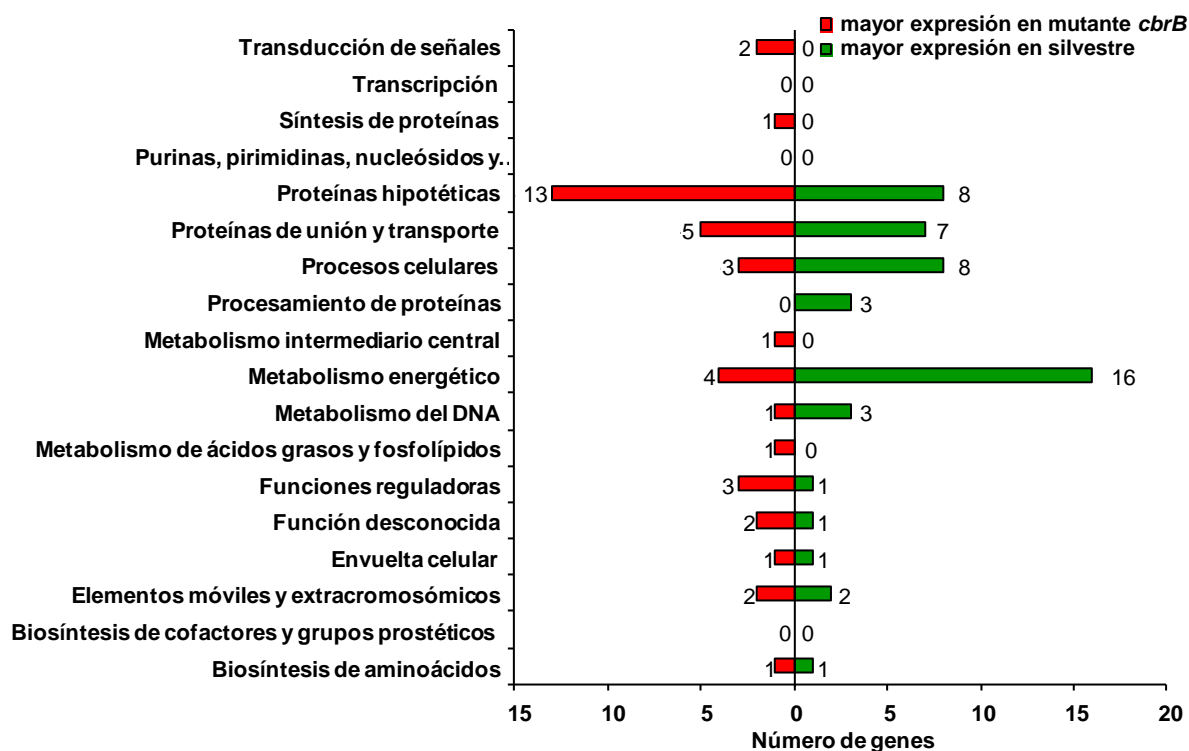


Figura 20. Genes con expresión diferencial en *P. putida* KT2442 frente al fondo *cbrB* (MPO406) en L-aminoácidos. Se presenta un esquema del número de genes con expresión diferencial en medio mínimo con L-aminoácidos 0,6 mM ordenados en categorías funcionales. En rojo se muestran los genes con mayor expresión en el mutante *cbrB* (MPO406) y en verde aquéllos con mayor expresión en la estirpe silvestre.

4.2.1.2. Análisis comparativo del patrón de expresión de la estirpe mutante *ntrC* (MPO201) y el doble mutante *cbrBntrC* (MPO400).

Con el objeto de estimar si el control transcripcional ejercido por el sistema Cbr pudiera estar interrelacionado o parcialmente suplido por el sistema regulador Ntr, como se ha visto en otras especies de *Pseudomonas* (Li y Lu, 2007; Zhang y Rainey, 2008), se realizó un análisis transcriptómico en las mismas condiciones experimentales del apartado 4.2.1.1, comparando las estirpes mutantes *ntrC* (MPO201) y *cbrBntrC* (MPO400). En este caso, la carencia de NtrC hace patente la acción reguladora exclusivamente de CbrB en un medio definido con L-aminoácidos como fuente de carbono y de nitrógeno. Los genes expresados diferencialmente en estas condiciones conforme a los criterios seleccionados se representan en la figura 21, ordenados en categorías funcionales de la misma forma que en el apartado 2.1.1. En este caso se detectó la expresión diferencial de 122 genes, de los cuales 72 genes tenían una expresión más alta en el doble mutante *cbrBntrC*, y 50 genes tenían una expresión más alta en el mutante *ntrC*. Los datos numéricos de todos los parámetros que describen el comportamiento de cada gen de *P. putida* se presentan en la tabla S2 del Anexo.

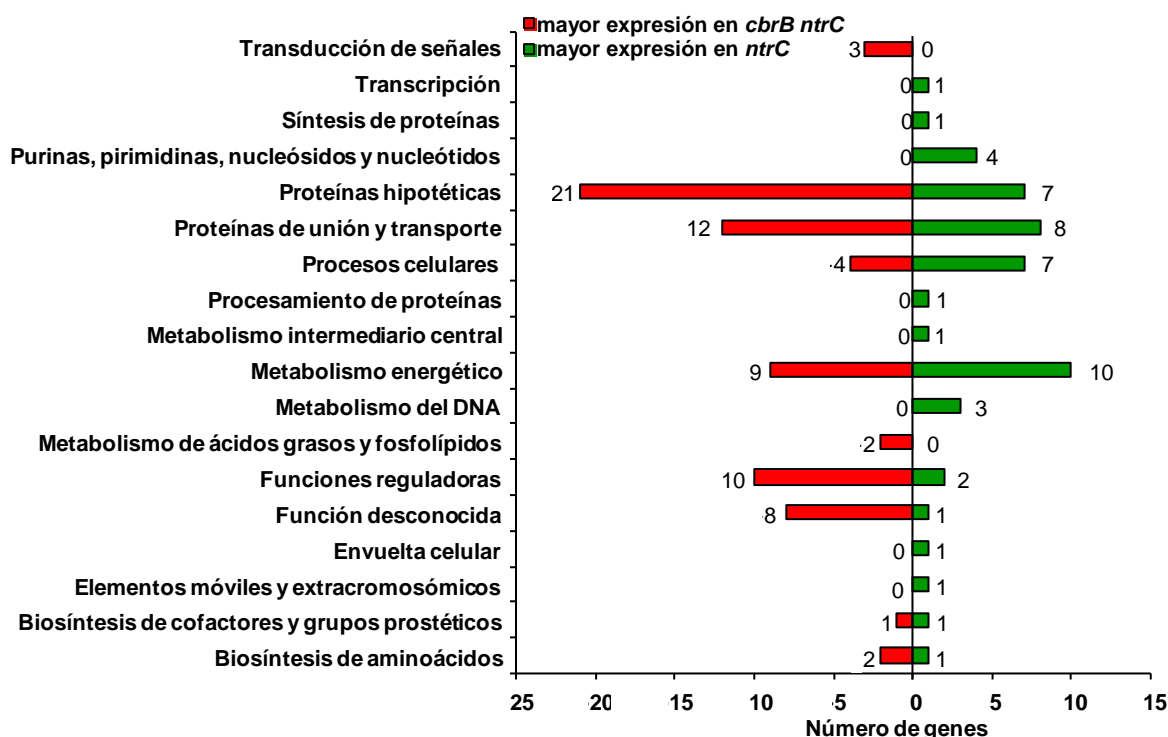


Figura 21. Genes con expresión diferencial en el mutante *ntrC* (MPO201) en comparación con la estirpe *cbrBntrC* (MPO400) creciendo en un medio definido con L-aminoácidos. Se representa el número de genes con expresión diferencial agrupados por categorías funcionales. En rojo se muestran los genes con mayor expresión en MPO400 (*cbrBntrC*) y en verde aquéllos con mayor expresión en MPO201 (*ntrC*).

4.2.1.3. Integración de ambas aproximaciones y agrupación según los patrones de expresión

De todos los genes que presentaron una expresión diferencial, 37 de ellos lo hicieron en ambas aproximaciones (wt vs. *cbrB* y *cbrB* vs *cbrBntrC*). Sólo 16 genes de los detectados se encontraban más expresados en un fondo carente de *cbrB* mientras que 21 tenían una expresión más alta en un fondo silvestre.

Los análisis de transcriptómica permitieron establecer dos grandes grupos de genes con un patrón de expresión similar; 1) Activados por CbrB (serían aquellos que presentan una expresión más alta en el fondo silvestre frente al fondo *cbrB*), y 2) Reprimidos por CbrB (aquellos con una expresión más alta en el fondo *cbrB* comparado con el silvestre). Además dentro de estos grupos se podrían distinguir aquellos genes que presentan alguna variación adicional en su expresión cuando NtrC está activo. Por esta razón, se valoró que era más informativo establecer una clasificación según las categorías funcionales en las que se englobaran genes tanto activados como reprimidos por CbrB. En estas categorías se destacan los siguientes grupos:

1. Transporte y/o metabolismo de aminoácidos

2. Transporte y/o metabolismo de fuentes de carbono
3. Respuesta a estrés
4. Adhesión celular y movilidad/quimiotaxis
5. Elementos reguladores que incluían sensores y reguladores de respuesta
6. Otros genes que no encajaban en las otras categorías pero que se consideraron relevantes.

Grupo 1: Transporte y/o metabolismo de aminoácidos. En esta categoría se englobaron aquellos genes que según su anotación en la base de datos (<http://cmr.icvi.org/tigr-scripts/CMR/CmrHomePage.cgi> o <http://www.pseudomonas.com/>) parecían relacionados con el transporte de algunos aminoácidos en general (PP1059, PP1068–70 y PP1138–41), o bien con el catabolismo de algunos aminoácidos específicos; histidina (*hutGHU*: PP5029, PP5032–33), tirosina (*tyrB1*: PP1972; maleylacetoacetate isomerase: PP4619), arginina (*arcA*: PP1001), aspartato (*aspA*: PP5338), ornitina (ornithine cyclodeaminase: PP3533) y serina (*serC*: PP1768). Todos los genes involucrados en transporte de aminoácidos mostraron una expresión más baja en el fondo *cbrB* (MPO406) en comparación con la estirpe silvestre, por lo que parece que la transcripción de estos sistemas de transporte podría tener un control positivo ejercido por CbrB. Los genes catabólicos también se encontraban regulados de la misma forma, salvo *arcA* y PP3533 que podrían estar reprimidos por CbrB.

Grupo 2: Transporte o utilización de fuentes de carbono no nitrogenadas. La comparación entre el transcriptoma de las estirpes silvestre y *cbrB* reveló la presencia de genes cuyos productos están involucrados en el transporte de distintas fuentes de carbono o en la utilización de fuentes de carbono no nitrogenadas, como *dctP* (transporte de dicarboxilatos, PP1169), *rbsB* (transporte de ribosa, PP2454) o aquellos involucrados en la utilización de glucosa a través de la ruta de Entner-Doudoroff (PP1022–PP1024). Adicionalmente, se encontraron genes expresados diferencialmente involucrados en el ciclo de Krebs o del glioxilato, como los que codifican la isocitrato deshidrogenasa (*icd*, PP4012) y la isocitrato liasa (*aceA*, PP4116). Todos ellos, a excepción de *icd* (PP4012), mostraron una expresión más alta en el mutante *cbrB*.

Grupo 3: Respuesta a estrés. Incluimos genes que codifican chaperonas tales como *groEL-ES* (PP1360–1361), proteínas de respuesta a choque térmico como *gprE* (PP4728) y el operón *hsIVU* que codifica un proteasoma de respuesta a estrés inducible por choque térmico (calor), que recicla proteínas no plegadas (PP5000–01) (Goldberg, 2003). Además, incluimos genes que codifican productos con un posible papel en la tolerancia a estrés oxidativo puesto que codifican enzimas involucradas en detoxificación, como *sodB* (superóxido dismutasa B, PP0915) y *ahpC* (alquil hidroperóxido reductasa subunidad C, PP2439). También se incluye el gen PP4261 que codifica una

ATPasa translocadora de metales pesados (Cu^{2+}). Todos los genes de esta categoría estaban reprimidos por CbrB.

Grupo 4: Adhesión celular, movilidad o quimiotaxis. Se agruparon genes involucrados en biosíntesis y transporte de polisacáridos que contribuyen a la adhesión célula-célula (PP3126, PP3128), dos genes que codifican proteínas con dominio GGDEF, involucradas en la adhesión de bacterias a sustratos sólidos (PP1155 y PP3932) y el gen que codifica la adhesina LapF (PP0806). En este grupo además se incluyeron genes que codifican componentes de la síntesis de flagelo así como otros componentes de la maquinaria del mismo, genes que codifican la posible flagelina FlaG (PP4377) y la subunidad estructural FliC (PP4378). Estos genes eran activados por CbrB mientras que el gen PP4383, que codifica el precursor del anillo flagelar P (FlgI), estaba reprimido por CbrB. Por último, se encontraron 3 genes que codificaban posibles proteínas de quimiotaxis con expresión alterada: PP0320 y PP1371, que son MACPs (Methyl Accepting Chemotaxis Proteins), y PP4333 que codifica CheW.

Grupo 5. Reguladores. En la quinta categoría se incluyeron 17 genes cuyos productos eran factores de transcripción, reguladores o sensores, de los que sólo 3 (PP1182, PP2220 y PP4693) estaban sujetos a control positivo por CbrB, mientras que el resto estaban reprimidos por CbrB (Tablas S1 y S2 del Anexo). Aunque muchos de estos genes presentan similitud a otros reguladores, la función de muchos de ellos no está caracterizada. Entre los genes de esta categoría encontramos aquellos que codifican: *fruR* (PP0792) que en *E. coli* ha sido descrito como el regulador global de la asimilación de D-fructosa y controla diferentes rutas del metabolismo del carbono; el sistema de dos componentes *copRS* (PP5383-5384), involucrado en la homeostasis del cobre en *Pseudomonas*; los factores de transcripción PfrI (PP4244, un factor sigma extracitoplásmico similar a PvdS) y PfrA (PP0191, un factor anti- σ^{70}), ambos requeridos para la biosíntesis de sideróforos en *Pseudomonas fluorescens*. Todos estos genes presentaron una expresión más alta en el mutante *cbrB* frente a la estirpe silvestre. En este grupo se incluyó además el gen que codifica el propio CbrB (PP4696), lo que podría indicar que está sujeto a autorregulación y que controla su propia síntesis.

Grupo 6: Otros. Por último, se definió un sexto grupo que contenía genes de diversa índole que no encajaban en las otras categorías, pero que consideramos relevantes para este trabajo y que codificaban: putativas proteínas de membrana externa (*oprQ*: PP0268, *oprH*: PP1185, PP0883 y PP3764) o sistemas de transporte (PP3931, PP5207-08, PP5322) y una putativa ferredoxina asociada a la bacterioferritina (PP1083), junto con un grupo de genes que codifican para proteínas hipotéticas o de función desconocida. En esta categoría también incluimos genes cuyos productos participan en la síntesis de algunos compuestos de la membrana (PP1912, PP4063 y PP5365), que se encontraban reprimidos por CbrB.

4.2.2. Validación de los resultados de los *microarrays* mediante RT-PCR cuantitativa

Con el fin de confirmar la validez de los resultados obtenidos mediante los ensayos de *microarrays*, se procedió a validar los datos de la expresión de algunos genes mediante RT-PCR cuantitativa (RT-qPCR). Para ello se utilizaron las mismas condiciones experimentales que en los ensayos de transcriptómica. Se escogieron genes dentro de cada una de las distintas categorías funcionales y concretamente: *tyrB1* (tirosina aminotransferasa, PP1972), *hutU* (urocanato hidratasa, PP5033), *lapF* (adhesina, PP0806), *cbrA* (PP4695) y *cbrB* (PP4696). Se extrajo RNA total de las cepas silvestre y MPO406 según se describe en materiales y métodos, y el patrón de expresión se representó como el *ratio* entre la expresión obtenida en la estirpe silvestre entre la obtenida en la estirpe mutante *cbrB*. En la tabla 7 se representan la medida de expresión génica obtenida en los *microarrays* y mediante RT-PCR cuantitativa. Como se puede apreciar, los resultados de expresión mostraron una tendencia igual para los ocho genes analizados independientemente de la forma de análisis, aunque, como cabía esperar, las diferencias o veces de cambio en la expresión de cada gen cuantificado mediante RT-qPCR resultó ser mayor al obtenido mediante el análisis de *microarrays*. Se confirmó de esta manera que los genes involucrados en la utilización de tirosina e histidina se encontraban activados por CbrB. Esto correlaciona con el defecto que presentaba el mutante *cbrB* en su crecimiento usando estos aminoácidos como fuente de carbono (Apartado 1.1). Los análisis de RT-qPCR también confirmaron que la expresión de *lapF* era mayor en un fondo *cbrB* (MPO406) comparado con la estirpe silvestre, indicando que está reprimido por CbrB. *cbrA* no mostró dependencia de CbrB en ninguna de las dos aproximaciones y por último, la expresión de *cbrB* también era más elevada en el mutante MPO406 que en la estirpe silvestre, lo que parecía indicar que existía una autorregulación negativa.

Gen	Expresión (Ratio KT2442/ <i>cbrB</i>)	
	RT-qPCR	Microarrays
<i>tyrB1</i>	2,19 ± 0,88	1,90
<i>hutU</i>	2,19 ± 1,13	2,10
<i>lapF</i>	- 4,49 ± 1,16	- 2,40
<i>cbrB</i>	- 4,87 ± 1,98	- 1,90
<i>cbrA</i>	- 1,37 ± 0,18	- 1,08

Tabla 7. Validación mediante RT-qPCR de la expresión de determinados genes en las condiciones ensayadas para los *microarrays*. Se muestra la expresión diferencial reflejada como veces de cambio en la expresión de los genes seleccionados para las estirpes de *P. putida* KT2442 silvestre y mutante *cbrB* (MPO406), en un medio

mínimo con L-aminoácidos 0.6 mM. Los valores de expresión de la PCR cuantitativa representan la media de al menos 3 réplicas biológicas \pm su desviación estándar. Se muestran también los valores de expresión obtenidos en los análisis de *microarrays* para esos genes en las mismas condiciones. Los valores positivos indican que el gen presenta una expresión más alta en la estirpe silvestre y los negativos una expresión más alta en el mutante *cbrB*.

4.2.3. Caracterización de la regulación de los elementos del sistema de dos componentes

Los análisis de transcriptómica mostraron que el sistema Cbr de *P. putida* está involucrado en el transporte y/o catabolismo de distintos aminoácidos pero también en otros procesos celulares muy diversos. Era interesante investigar si la regulación ejercida por CbrB sobre esos procesos era directa o podría estar amplificada por otros reguladores a modo de cascada. En primer lugar pareció necesario estudiar en profundidad la regulación de la expresión del sistema de dos componentes y su localización genómica.

4.2.3.1. Determinación de las condiciones de inducción de *cbrB*

En primer lugar, y para estudiar el control global de CbrB sobre el genoma de *P. putida*, consideramos importante estudiar los niveles de expresión de *cbrB* en distintas condiciones. Para ello se realizaron ensayos de RT-qPCR empleando oligonucleótidos que hibridaban en la región codificante (*cbrB*23-1Q/ *cbrB*74-2Q), y se estudió su expresión en presencia de distintas fuentes de carbono. Se recogieron cultivos de las estirpes silvestre y mutante *cbrB* en fase exponencial media en LB y en medio mínimo con citrato y succinato como fuente de carbono o L-aminoácidos como fuente de carbono y nitrógeno, y se retrotranscribió el RNA como se detalla en materiales y métodos.

Como se muestra en la Figura 22, la expresión de *cbrB* no mostró variaciones significativas en su expresión en los distintos medios de cultivo analizados (LB, medio mínimo con succinato o citrato como fuente de carbono y L-aminoácidos como fuente de carbono y nitrógeno). Podemos decir por lo tanto, que la expresión de *cbrB* es constitutiva en los medios analizados, y por lo tanto independiente de la naturaleza de las fuentes de carbono y nitrógeno.

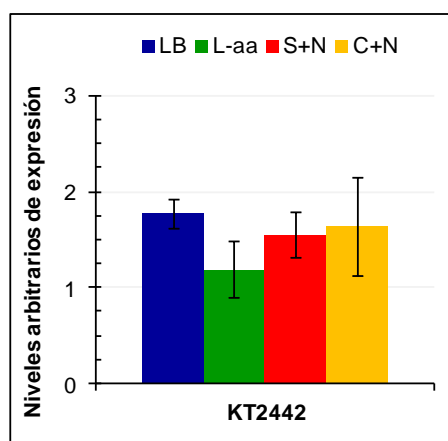


Figura 22. Medida de la expresión de *cbrB* por RT-qPCR en *P. putida* KT2442. Se analizó la expresión de *cbrB* mediante RT-qPCR de células de *P. putida* KT2442 creciendo en fase exponencial media ($A_{600} = 0,3$) en LB, L-aminoácidos (L-aa), succinato+amonio (S+N) y citrato+amonio (C+N).

4.2.3.2. Determinación del inicio de la transcripción de *cbrA* y *cbrB*

Para determinar si *cbrA* y *cbrB* constituyen unidades transcripcionales independientes y localizar los extremos 5' de sus RNA mensajeros, se realizaron ensayos de *primer extension* en la estirpe silvestre utilizando los oligonucleótidos PExcbrB y PexcbrA, respectivamente. Además se realizó el análisis de forma paralela en la estirpe mutante *cbrB* (MPO406) para localizar otros posibles inicios de la transcripción en esta estirpe. Las condiciones del ensayo fueron las mismas que las empleadas en los análisis de *microarrays* para garantizar la inducción del sistema.

No fue posible detectar el transcrito correspondiente a *cbrA* en las condiciones ensayadas. Es posible que los niveles de la transcripción no sean lo suficientemente altos para ser detectados mediante esta técnica. Hay que destacar que este mismo fenómeno ha sido descrito en *Pseudomonas aeruginosa* (Nishijyo y col., 2001). Tampoco fue posible detectar la presencia de transcrito de *cbrB* en la estirpe silvestre (datos no mostrados), aunque sí se consiguió en el mutante *cbrB* MPO406 (figura 23A). Este resultado coincide con los datos de expresión de los análisis de *microarrays* y RT-qPCR, que mostraban una mayor expresión del gen *cbrB* en MPO406 en comparación con la estirpe silvestre. El inicio de la transcripción para *cbrB* localizaba en la primera A de una ristra de tres situada a 123 nucleótidos del inicio de la traducción. Aguas arriba y a la distancia adecuada del inicio se localizó una secuencia que cumple el consenso para promotores tipo σ^{70} . La información obtenida del *primer extension* se resume en la Figura 23B.

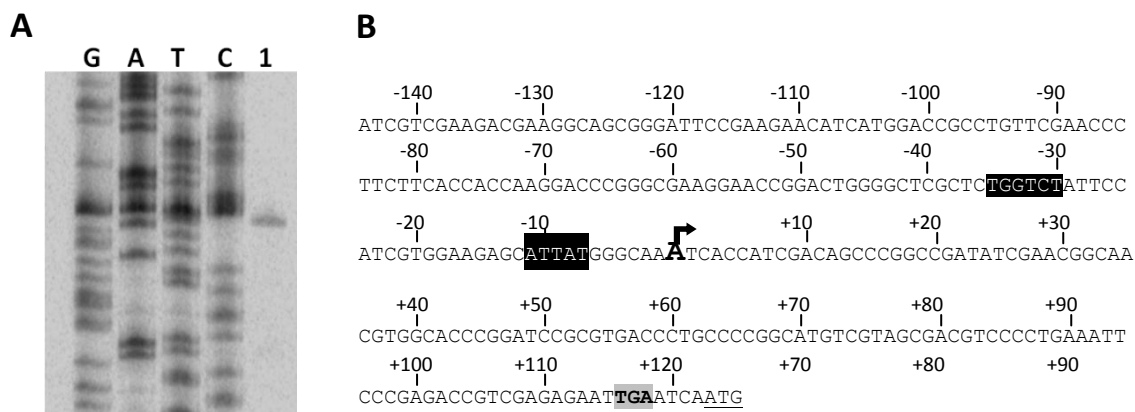


Figura 23. Identificación del inicio de transcripción de *cbrB*. **A.** Reacción de *primer extension* con RNA obtenido de la estirpe MPO406 cultivada en un medio definido con L-aminoácidos 0,6 mM. Los carriles 1-4 indican las reacciones de secuenciación para localizar el inicio de transcripción, con los nucleótidos G, A, T o C, mientras que el carril 5 muestra la reacción de extensión del oligonucleótido en el mutante *cbrB*. **B.** Esquema de la región promotora de *cbrB*. El codón de inicio de *cbrB* se muestra como ATG, el sitio de inicio de la transcripción se identificó como el nucleótido A (en negrita e indicado con una flecha) y el posible promotor de tipo $\sigma 70$ encuadrado en cajas negras. El codón de fin de *cbrA* se indica como los nucleótidos TGA, en caja gris.

Para identificar el de inicio de la transcripción en la estirpe silvestre y comprobar si coincidía con el identificado en el mutante *cbrB*, se clonó el gen *cbrB* expresado bajo su propio promotor en un vector de expresión (pMPO1250) y se transformó en las estirpes silvestre y mutante *cbrB* (MPO406). Se recogieron cultivos de ambas estirpes en fase exponencial en distintas fuentes de carbono y en presencia del antibiótico del plásmido y se realizó de nuevo el ensayo de *primer extension* en las mismas condiciones. En esta ocasión, sí fue posible detectar la transcripción de *cbrB* en la estirpe silvestre y se comprobó que el inicio correspondía al mismo nucleótido que había sido detectado en el mutante *cbrB* (Figura 24). Aunque el ensayo de primer extension no es una técnica cuantitativa y se habían detectados previamente los niveles de transcripción de *cbrB* mediante RT-PCR cuantitativa, hay que destacar que el patrón de expresión detectado por ambas técnicas era comparable en el caso de la estirpe silvestre (Figura 24; carriles 1, 3, 5 y 7, ver figura 22). Los niveles de *cbrB* en un medio con L-aa en la estirpe mutante fueron los más altos, dato que concuerda con el efecto auto-represor detectado en los microarrays, que se realizaron en este medio (Figura 24, carriles 3 y 4). Los niveles de expresión de *cbrB* en la estirpe mutante (MPO406) fluctuaron en mayor medida que en la estirpe silvestre (carriles 2, 4 y 6), siendo máximos en L-aa y mínimo en LB.

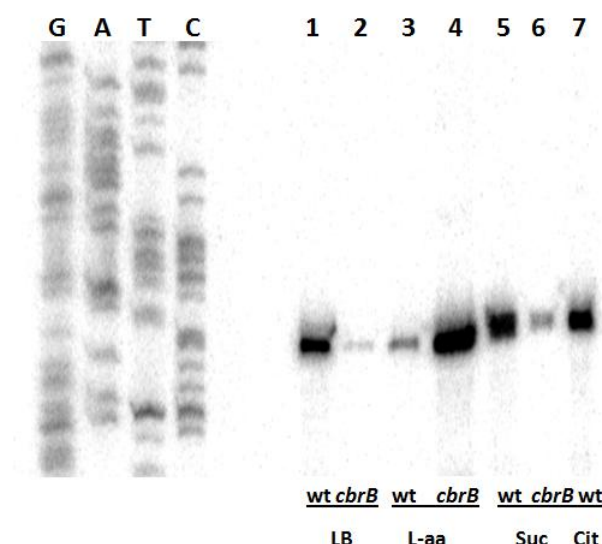


Figura 24. Identificación del inicio de transcripción de *cbrB* mediante *primer extension* con un plásmido de expresión que contiene *cbrB*. Se muestran las reacciones de *primer extension* a partir de RNA obtenido de las estirpes silvestre (wt, carriles 1, 3, 5 y 7) y mutante *cbrB* (MPO406; carriles 2, 4 y 6) que contienen el plásmido pMPO1250 cultivadas con LB (1 y 2), o en un medio definido con L-aminoácidos 0,6 mM (3 y 4) como fuente de carbono y nitrógeno, y succinato 20 mM (5 y 6) o citrato 10 mM (7) como fuente de carbono. Las reacciones de secuenciación para localizar el inicio de transcripción se muestran como G, A, T y C, obtenidas en la cadena reversa.

El hecho de que se haya localizado un inicio de la transcripción para *cbrB* significa que se expresa desde su propio promotor, y que esta transcripción es independiente de la posible transcripción proveniente aguas arriba desde *cbrA*. Hay que destacar que la región intergénica entre *cbrA* y *cbrB* es muy pequeña (4 bp) como se puede observar en la figura 23, por lo que este promotor se encuentra dentro de la región codificante de *cbrA*. Además, la localización de una secuencia de un posible promotor tipo σ^{70} apunta a que la expresión de *cbrB* sería constitutiva, lo cual es coherente con los resultados de RT-qPCR cuantitativa en distintos medios en el apartado anterior.

4.3. Capítulo 3. Caracterización fenotípica del mutante *cbrB* (MPO406).

El abordaje transcriptómico realizado en el capítulo 2 permitió establecer una serie de posibles funciones de CbrB por asociación la expresión diferencial de determinados genes. Por ello, se procedió a realizar una caracterización de diversos fenotipos relacionados. Por ejemplo, la expresión diferencial de genes relacionados con la formación/ensamblaje del flagelo entre las estirpes silvestre y mutante *cbrB*, apuntaba hacia una posible alteración en la movilidad o en quimiotaxis. Del mismo modo, la expresión alterada en genes relacionados con la homeostasis del cobre podría reflejar un fenotipo en resistencia o sensibilidad a cobre. Por ello se diseñaron una serie de experimentos encaminados a identificar nuevos fenotipos en el mutante MPO406, para sumar a

la caracterización realizada en el capítulo 1 y relacionada con la capacidad de asimilar distintos aminoácidos (apartado 1.1)

4.3.1. Ensayos de movilidad y quimiotaxis

En el análisis por *microarrays* se detectó una expresión alterada de componentes estructurales del flagelo, como la flagelina (FliC; PP4377 y FlaG; PP4378), siendo más alta en la estirpe silvestre en comparación con el mutante *cbrB*, lo que implicaba posible activación por parte de CbrB. También se detectaron diferencias de expresión en genes de quimiotaxis (PP0320, PP4333, con expresión más alta en un mutante *cbrB*, y PP1371, con expresión más alta en la estirpe silvestre) (ver Tablas 1 y 2 del Anexo). La expresión alterada de estos genes podría reflejarse como un defecto en movilidad o en quimiotaxis, si es que le impidiera responder a un quimiotáctico por su falta de movilidad. Por ello, se realizaron distintos experimentos encaminados a comprobar esta hipótesis.

Los movimientos denominados de *swimming* y *swarming* son dos tipos de movimientos bacterianos dependientes del flagelo aunque existen diferencias entre ellas. Mientras *swimming* es un movimiento individual que ocurre en un medio líquido, *swarming* es un movimiento coordinado poblacional sobre una superficie en el que las células se alinean a lo largo de su eje longitudinal formando filas multicelulares. Este movimiento requiere un mayor número de flagelos por célula, quizá debido a la fricción sobre una superficie de células moviéndose mediante *swarming* frente al nado en medio líquido de células moviéndose mediante *swimming* (Harshey, 1994, 2003). Por ello, se evaluó la capacidad de las estirpes silvestre y mutante *cbrB* (MPO406) de realizar ambos tipos de movimientos. Como control se utilizó un mutante *fleQ* de *P. putida*, carente de flagelo (Arora y col., 1997)

4.3.1.1. Ensayos de *swimming* en agar blando

Los ensayos de movilidad por *swimming* se realizaron en placas de agar blando al 0,2 % con distintas fuentes de carbono (ver materiales y métodos, 3.1.5.6). Esta aproximación podría revelar un defecto en movilidad pero también un defecto en quimiotaxis puesto que conforme la bacteria consume los nutrientes localmente, se establece un gradiente de concentración de los mismos. Se inocularon las estirpes silvestre y mutante *cbrB* (MPO406) en placas de medio mínimo con prolina y succinato. El mutante *cbrB* mostraba un crecimiento más lento en prolina que la estirpe mutante (ver Figura 13), pero se utilizó este medio por establecer una limitación de carbono e intentar asegurar una activación del sistema Cbr. Además el ensayo se realizó en un medio con succinato como fuente de carbono, en el que no existían diferencias de crecimiento entre las estirpes. Se cuantificó la movilidad de las estirpes silvestre y mutante MPO406, usando como control el mutante *fleQ*. El mutante *cbrB* mostró un defecto en movilidad en un medio que contenía prolina (88%) y en menor

medida en un medio con succinato (70%) (Figura 25). El mutante *fleQ* no mostró apenas *swimming*, como cabía esperar (8 y 7 % respectivamente). La reducción en la movilidad de un mutante *cbrB* en ambos medios indicaba que CbrB estaba participando en el control del movimiento de *swimming*.

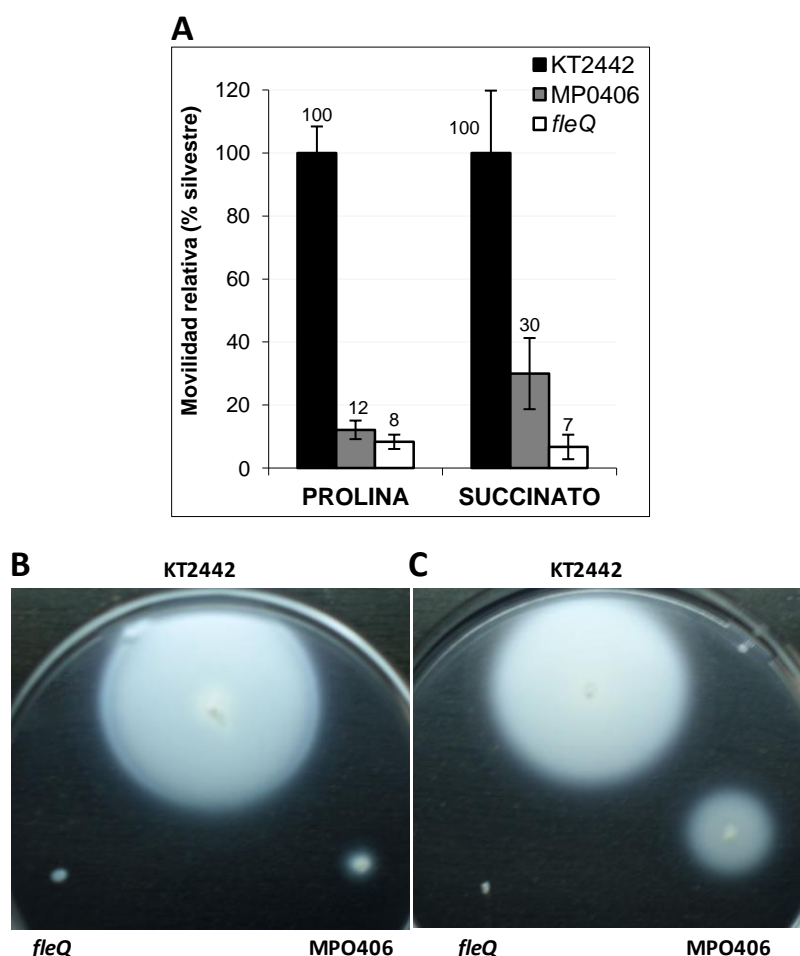


Figura 25. Ensayos de movilidad por *swimming* en agar blando. **A.** Representación gráfica de la movilidad de las estirpes silvestre y mutantes *cbrB* (MPO406) y *fleQ* en placas de agar 0,2 % con prolina o succinato como fuente de carbono, medida como distancia entre el punto de inoculación y la migración final. Se muestra la movilidad relativa a la de la estirpe silvestre. Se muestra la media de un mínimo de 3 réplicas con sus respectivas desviaciones estándar. En los paneles inferiores se muestra una réplica representativa de las tres estirpes **B.** en placas de agar 0,2 % con prolina como fuente de carbono, y **C.** en placas de agar 0,2 % con succinato como fuente de carbono.

4.3.1.2. Ensayos de *swarming* en agar blando

Se hicieron ensayos de *swarming* en placas de agar blando 0,5 % con triptona como fuente de carbono y nitrógeno, como se describe en materiales y métodos (apartado 3.1.5.6). La concentración de agar para los ensayos de *swarming* es más alta que en los ensayos de *swimming*, y además requiere un control de las condiciones de humedad y temperatura más estrictas. Las estirpes *P. putida* KT2442 silvestre y mutantes *cbrB* y *fleQ* fueron inoculadas en la superficie del agar y se incubaron las placas a 25 °C durante unas 40 horas. Como se observa en la figura 26, el mutante *cbrB*

era incapaz de realizar movimiento de *swarming*, al igual que un mutante *fleQ*, mientras que la estirpe silvestre exhibió movimiento de *swarming* consistente en anillos concéntricos de distinta apariencia. Hay que destacar que el fenotipo de *swarming* para el mutante *cbrB* es más severo que el de *swimming*.

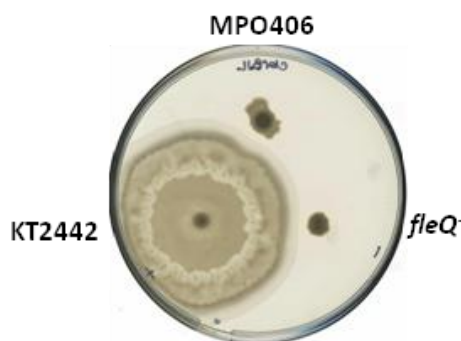


Figura 26. Ensayos de movilidad por *swarming* en agar blando. Movilidad a través de *swarming* de *P. putida* KT2442 y mutantes *cbrB* (MPO406) y *fleQ* en placas de PG- agar 0,5 % a partir del punto de inoculación en superficie.

4.3.1.3. Caracterización del flagelo

Cómo se ha descrito en los apartados 3.1.1 y 3.1.2, una alteración en la movilidad bacteriana en placas de agar blando no permitía discriminar entre un defecto en el flagelo o una alteración en la quimiotaxis, dado que el flagelo podría permanecer estructuralmente intacto pero podría no ser funcional. Por ello, se observó la estructura del flagelo mediante microscopía. En primer lugar se realizó una tinción específica de flagelo con un reactivo específico basado en la tinción de Ryu (materiales y métodos, 3.5) y se visualizaron las estirpes silvestre y mutante *cbrB* (MPO406) por microscopía óptica (Figura 27A). Se comprobó que *P. putida* KT2442 tenía varios flagelos polares y la frecuencia de células flageladas en el mutante era similar al silvestre. La observación de esta tinción con mayor precisión mediante el uso de microscopía confocal no permitió establecer diferencias significativas entre la estructura del flagelo en la estirpe silvestre y el mutante *cbrB* (MPO406) (Figura 27B). La visualización mediante microscopía confocal permitió confirmar la presencia de un flagelo estructuralmente organizado tanto en la estirpe silvestre como en la mutante.

Para comprobar si la estructura del flagelo se encontraba alterada en la estirpe mutante *cbrB* con respecto a la silvestre, se procedió a realizar una inmunodetección con un anticuerpo anti-FliC que es la proteína estructural más abundante del flagelo. Para ello se empleó un anticuerpo contra FliC de *Pseudomonas aeruginosa* (amablemente cedido por el Prof. Reuben Rampal). Los ensayos de inmunodetección con anti-FliC permitieron detectar igual de eficientemente la proteína FliC en ambas estirpes (Figura 27C).

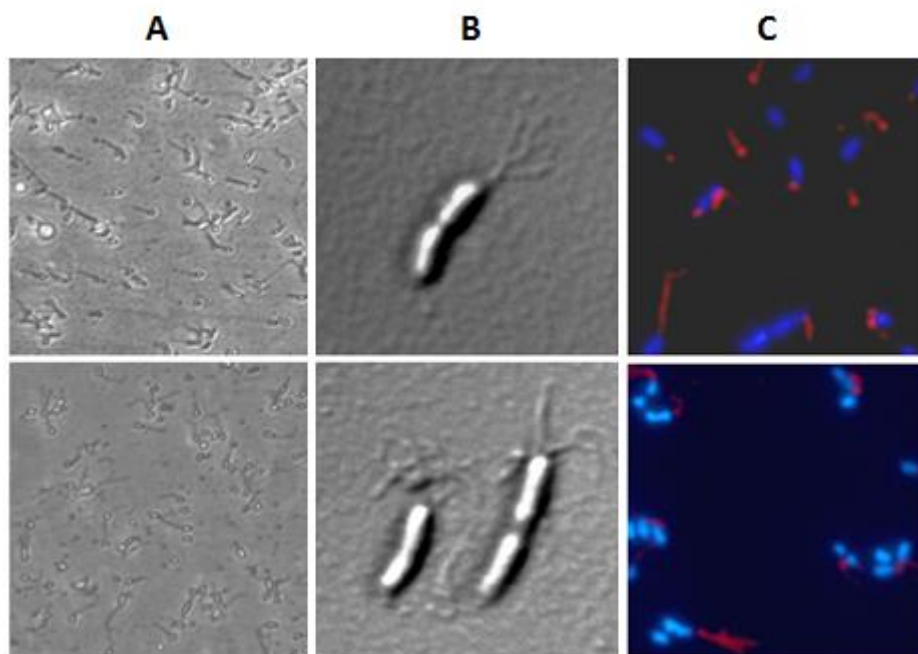


Figura 27. Visualización de flagelo por microscopía. Se realizó una tinción de flagelo en *P. putida* KT2442 y MPO406 con cristal violeta y se visualizó con microscopía de contraste de fases (A) y confocal (B). Además se llevó a cabo una tinción del flagelo por inmunofluorescencia con Anti-FliC (rojo) y los cromosomas se tiñeron en azul (C). En el panel superior se muestra la estirpe silvestre y en el inferior la estirpe mutante *cbrB* (MPO406).

Los datos obtenidos en este apartado así como la identificación de genes con expresión diferencial relacionados con quimiotaxis (apartado 2.1.3.) apuntan a que la falta de movilidad observada en el mutante *cbrB* puede ser debida a una alteración de la quimiotaxis. El mutante tiene un flagelo estructuralmente intacto pero quizá no es capaz de orientarlo correctamente, ya sea por problemas motrices o por defectos en detección de compuestos a través de proteínas especializadas (MACPs).

4.3.2. Resistencia a estrés por metales pesados

Los datos de *microarrays* revelaron que algunos genes posiblemente involucrados en la homeostasis de metales tenían una expresión alterada en el mutante *cbrB* (MPO406) con respecto a la estirpe silvestre. Algunos de estos genes, como *copRS*, *pfrI* y *pfrA* y aquellos que codificaban para PP1083 (*bacterioferritin-associated ferredoxin*), reprimidos por CbrB, PP3155 (*outer membrane ferric siderophore receptor*, activado por CbrB) y PP5322 (reprimido por CbrB) podrían participar en procesos relacionados con la tolerancia o detección de metales en el ambiente. Por ello se procedió a analizar la resistencia a diversos metales por parte de ambas estirpes, mediante ensayos de dilución en gota y conteo de viables. Se analizó por tanto, la resistencia a níquel, cobre, cobalto y zinc.

4.3.2.1. Ensayo de dilución en gota en presencia de metales pesados

Se realizaron diluciones seriadas de cultivos de las estirpes silvestre y mutante *cbrB* (MPO406) y se sembraron en placas de LB con níquel 2,5 mM, cobre 5 mM, cobalto 0,6 mM o zinc 5 mM (ver materiales y métodos, 3.1.5.4). No se observaron diferencias de crecimiento entre las estirpes silvestre y MPO406 en un medio que contenía níquel o cobalto (Figura 28). Sin embargo, se observó que la estirpe mutante era capaz de crecer a concentraciones más altas que la silvestre en presencia de cobre y zinc. Además, la presencia de zinc en el medio provocaba la producción de sideróforo fluorescente en ambas estirpes, excitables por luz ultravioleta (dato no mostrado).

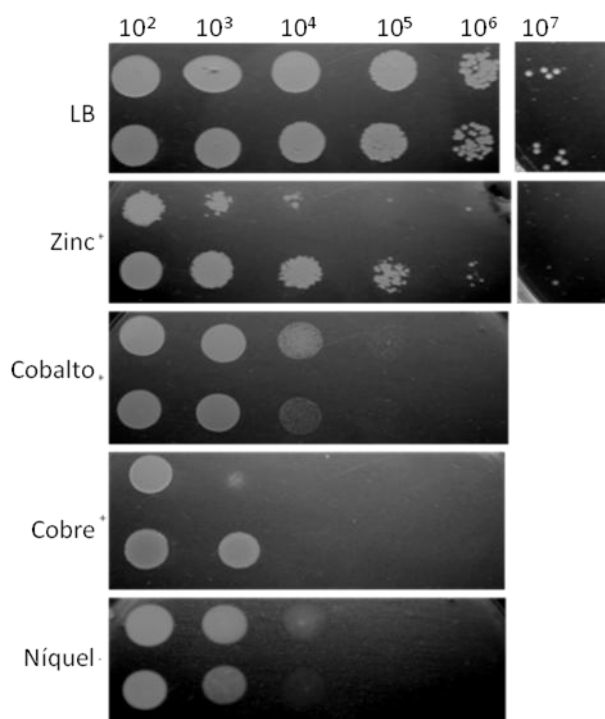


Figura 28. Resistencia a metales pesados en dilución en gota. Las estirpes KT2442 silvestre y mutante *cbrB* (MPO406) fueron cultivadas en medio LB hasta que alcanzaron una densidad óptica de 0,5. Tras dilución seriada se sembraron en gotas de 10 µl en placas de LB en ausencia o presencia de los metales zinc, cobalto, cobre o níquel, y se incubaron a 30 °C durante 24 horas. Para cada panel de condiciones, el silvestre se muestra en la fila superior mientras que el mutante *cbrB* en la inferior. En la parte superior de la figura se muestran las diluciones realizadas.

4.3.2.2. Ensayo de supervivencia: conteo de número de viables en presencia de zinc y cobre

Dado que el ensayo de dilución en gota no era cuantitativo, se cuantificó la viabilidad de ambas estirpes en un medio LB que contenía zinc o cobre. No se cuantificó en presencia de los otros metales puesto que no se apreciaron diferencias en el ensayo de dilución en gota.

Se calculó de forma experimental la concentración mínima inhibitoria de cada metal en medio LB para realizar el conteo de viables, como se detalla en materiales y métodos (apartado 3.1.5.4), y se utilizó esa concentración en placa para sembrar distintas diluciones de un cultivo bacteriano a ABS_{600} de 0,5 (Figura 29).

Las estirpes silvestre y mutante no crecieron a concentraciones de cobre superiores a 4 mM (Figura 29A). La presencia de cobre a una concentración inferior a 4 mM no provocó una disminución apreciable de la viabilidad, indicando la existencia de un efecto umbral en la toxicidad del cobre en *P. putida*. A la concentración de 4 mM de cobre, la diferencia de viabilidad entre las estirpes silvestre y mutante fue máxima (31 veces), siendo de 0,4 y 13%, respectivamente.

El efecto del zinc en el medio provocó diferencias de viabilidad más notables entre las dos estirpes en un rango de concentración más amplio (Figura 29B), siendo la estirpe silvestre menos viable que el mutante en todas las condiciones ensayadas (de 2,3 a 17 veces). Las diferencias en la viabilidad entre las estirpes fueron más apreciables a las concentraciones más altas del metal (4-4,5 mM)

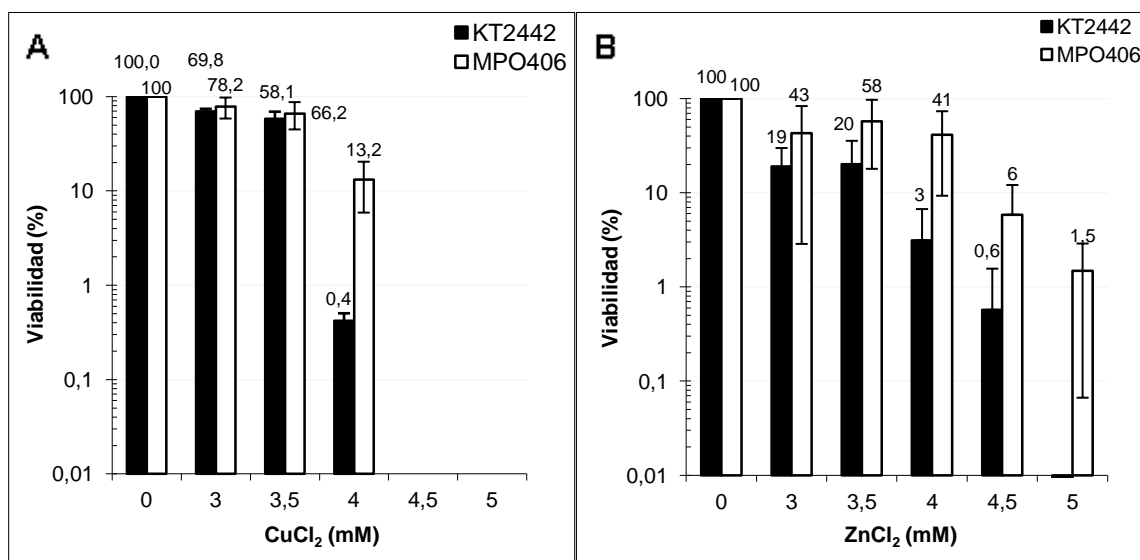


Figura 29. Conteo de viables en presencia de metales pesados. Se cuantificó la viabilidad de *P. putida* KT2442 (barras negras) y MPO406 (barras blancas) mediante diluciones seriadas y siembra en placas de LB en ausencia o presencia zinc (B) o cobre (A) al cabo de las 24 horas.

Los resultados de este ensayo indican que la estirpe mutante *cbrB* es más tolerante a la presencia de cobre y zinc que la silvestre, como ya sugería el ensayo de dilución en gota.

4.3.3. Almacenamiento/disponibilidad de hierro

Al analizar los datos obtenidos mediante los ensayos de transcriptómica se detectaron genes relacionados con la capacidad para producir sideróforos o el transporte del complejo sideróforo-hierro. Dos de ellos codificaban reguladores de la transcripción y aparecían reprimidos por CbrB; el factor sigma alternativo, PfrI (PP4244) descrito como un activador la expresión de genes de síntesis de pioverdinas/sideróforos, y un factor anti- σ^{70} , PfrA (PP0191). Además se identificó el gen *hemO*, una proteína implicada en el reciclaje de hierro a partir de grupos hemo y que también estaba reprimido por CbrB, y *sodB*, que codifica una superóxido dismutasa que se encontraba activada por CbrB. Ambas requieren hierro para ejercer su función. También se detectó una ferredoxina asociada a una bacterioferritina (PP1083) reprimida por CbrB y un receptor de sideróforos (PP3155) activado por CbrB. Para intentar correlacionar la expresión alterada de estos genes con un efecto fenotípico, se analizó la capacidad de almacenar hierro de ambas estirpes. Por ello, se cultivaron un medio mínimo en presencia o ausencia de Fe^{2+} a una concentración de 34 μM , concentración utilizada normalmente en el medio mínimo, y se monitorizó su crecimiento a lo largo del tiempo (materiales y métodos, 3.1.5.5). Como se muestra en la figura 30, en presencia de hierro el mutante *cbrB* (MPO406) presentó una fase de latencia ligeramente mayor que la estirpe silvestre, aunque la tasa de crecimiento para ambas estirpes resultó ser similar (t_g de 67 y 60 min, respectivamente). *P. putida* es capaz de utilizar trazas de hierro de forma muy eficiente, y crece en un medio sin hierro añadido alcanzando una densidad optica equiparable a la de un cultivo con hierro añadido al medio y alcanzando una tasa de crecimiento de un 70% de la de la estirpe silvestre. Sin embargo, en ausencia de hierro, el mutante *cbrB* sufrió una importante reducción en su velocidad de crecimiento y apenas conseguía alcanzar la mitad de la densidad óptica que un cultivo con hierro al cabo 24 horas de crecimiento (Figura 30). Estos datos sugieren que Cbr podría estar jugando un papel importante en la capacidad de *P. putida* de transportar o almacenar hierro en reservorios celulares.

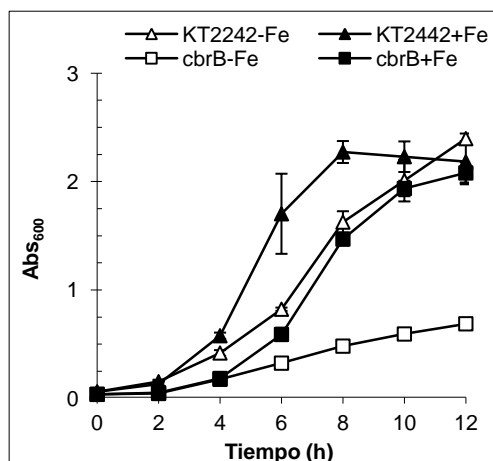


Figura 30. Capacidad de crecimiento en medio limitado en hierro (Fe^{2+}) Crecimiento de *P. putida* KT2442 y mutante *cbrB* (MPO406) en un medio mínimo con succinato como fuente de carbono en presencia (+Fe) o ausencia (-Fe) de hierro II (34 μM) a lo largo del tiempo. Se muestra la estirpe silvestre en triángulos y el mutante en cuadrados, relleno en presencia de Fe, vacío en ausencia.

4.3.4. Adhesión celular y vida multicelular

La detección de genes involucrados en un proceso de adhesión celular y/o señalización del estilo de vida multicelular en los análisis de *microarrays*, llevaron a caracterizar en detalle la capacidad de las estirpes silvestre y mutante *cbrB* para colonizar superficies sólidas. Los genes identificados incluían una adhesinas denominada LapF (PP0806) o genes implicados en la producción y/o transporte de exopolisacáridos (PP3126 y PP3128), los tres reprimidos por CbrB. También se identificaron genes que codificaban proteínas con dominios GGDEF/EAL (PP1155 y PP3932) asociadas a procesos de señalización vía c-di-GMP que determina la transición bacteriana de estado sésil (biofilm) a móvil (D'Argenio y col., 2002; Simm y col., 2004). Todos estos genes relacionados con la adhesión y formación de biofilms aparecían reprimidos por CbrB en los análisis de *microarrays*. Se diseñaron distintas aproximaciones para determinar si la alteración patrón de expresión podría verse reflejada en un fenotipo alterado en formación de biofilms en el mutante *cbrB* (MPO406).

4.3.4.1. Determinación de la capacidad de adhesión de un cultivo a una superficie sólida: Ensayos de formación de biofilm en microplaca

La capacidad de adhesión de las estirpes a una superficie sólida, se cuantificó mediante la formación de biofilms en placas multipocillo de poliestireno. Se utilizó como medio de cultivo un medio rico LB o un medio mínimo suplementado con L-aminoácidos 0,6 mM, y tras 8 horas de incubación, se midió la biomasa adherida a la superficie tiñendo con cristal violeta y solubilizando con etanol 96 %, como se describe en materiales y métodos (apartado 3.1.5.2). Se realizaron medidas de absorbancia a 620 nm (ABS_{620}) a distintos tiempos tras la inoculación. En la figura 31 se muestra la

dinámica de dispersión de las distintas estirpes a lo largo de 24 horas de incubación, en medio LB (Figura 31A) y en medio mínimo con L-aminoácidos 0,6 mM (Figura 31B). Claramente se observó el efecto superproductor de biofilm de los mutantes *cbrB* y *cbrB ntrC* en ambos medios, mientras que el mutante *ntrC* exhibió un fenotipo silvestre en cuanto a formación de biofilm. El mutante *fleQ* no produjo biofilm en LB, mientras en L-aa mostró una dinámica ralentizada respecto a la estirpe silvestre, aunque podía ser debido a que a 24 horas aún no había alcanzado la fase estacionaria, que es cuando se produce la dispersión del biofilm. En las figura 31C y D se muestra la biomasa relativa de los distintos mutantes, relativa a los valores de la estirpe silvestre para formación (8,5 h, panel B) y dispersión (24 h, panel C). Los resultados representados en la Figura 31C, revelaron que el mutante *cbrB* (MPO406) se adhería a una superficie sólida 4,7 veces más eficientemente que la estirpe silvestre en LB y 3,2 veces en un medio mínimo con L-aa como fuente de carbono y nitrógeno. Por otro lado el mutante *ntrC* (MPO201) no veía alterada su capacidad para formar biofilms en relación a KT2442. El doble mutante *cbrBntrC* (MPO400) mostró un fenotipo igual al del mutante *cbrB* (MPO406), con valores de 4,4 y 3,1 veces superiores en biomasa respecto a la estirpe silvestre. Estos resultados indicaban que la alteración en la adhesión era causada por la mutación en *cbrB* y no por un efecto causado por la carencia de NtrC. El mutante *fleQ*, utilizado como control negativo, no fue capaz de formar biofilms en LB (15 % de la adhesión del silvestre en LB). Sin embargo, en el medio definido con L-aminoácidos si consiguió el 75 % del biofilm producido por el silvestre.

La medida de dispersión del biofilm (Figura 31D) se realizó tras incubar 24 horas durante las cuales se consumen los nutrientes y se desencadena una dispersión del biofilm. Como era de esperar la biomasa de la estirpe silvestre se redujo tras 24 h, respecto a las 8 h. Sin embargo, el mutante *cbrB* (MPO406) además de presentar una formación de biofilm más alta que la estirpe mutante, también fue más resistente a la dispersión del mismo, observándose muy poca reducción de la biomasa del biofilm después de 24 h. Este efecto es máximo en el medio L-aa, en el que se observa que como consecuencia de la falta de dispersión, la biomasa el biofilm del mutante fue de unas 8 veces la de la estirpe silvestre. El mutante *cbrBntrC* presentó el mismo fenotipo que el mutante *cbrB*, mostrando 5 u 8 veces más resistencia a dispersión que la estirpe silvestre en medio LB o medio con L-aminoácidos, respectivamente. El mutante *ntrC* (MPO201) conservó un 77 % del biofilm del silvestre en medio LB y un 60 % en medio mínimo con L-aminoácidos, descartando así que la resistencia en el doble mutante fuera causada por la mutación *ntrC*.

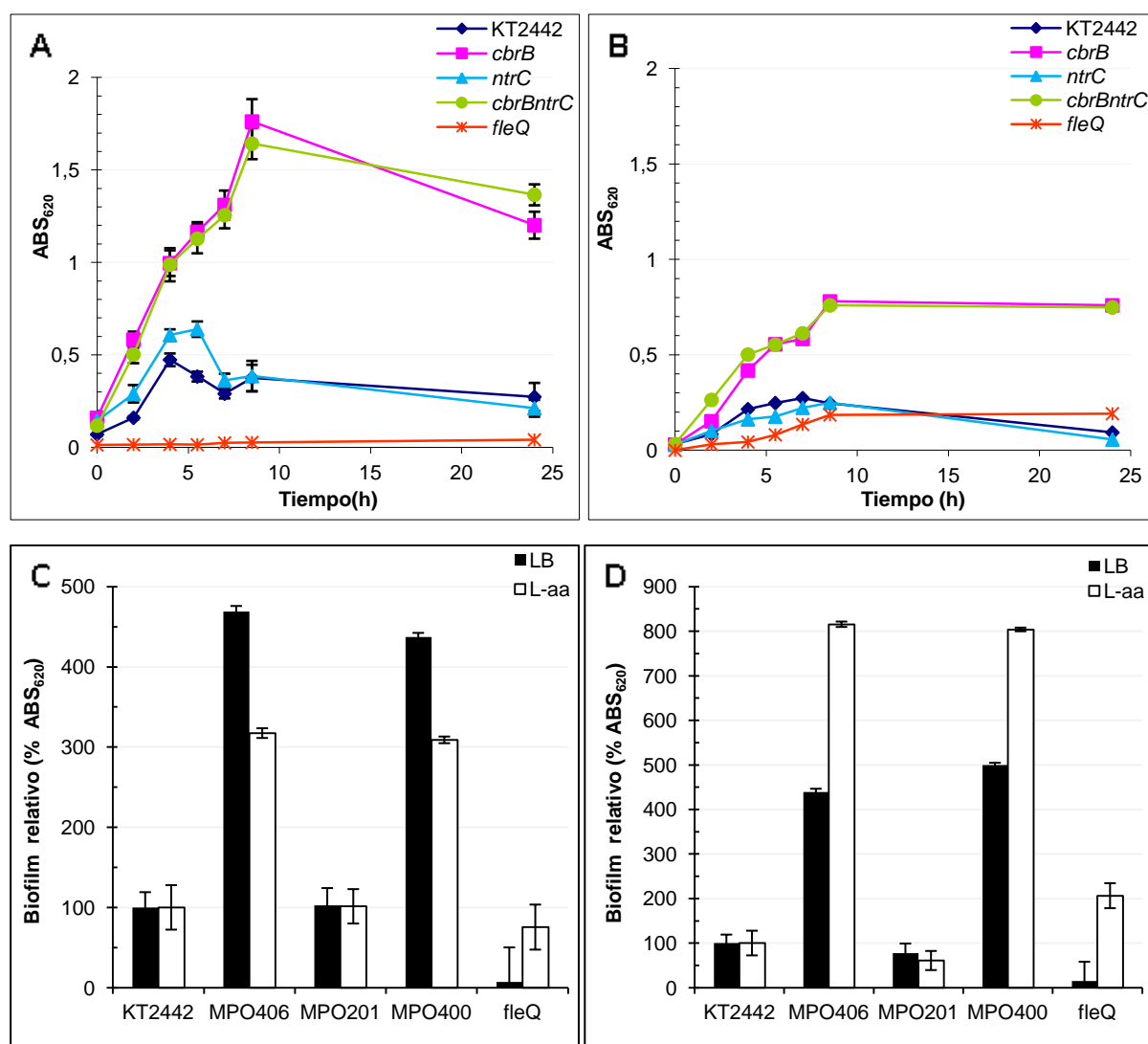


Figura 31. Adhesión a microplacas por *P. putida* en distintos medios. Se midió la cantidad de biofilm como la A_{620} generada por la biomasa adherida a la microplaca teñida con cristal violeta 0,1 % a lo largo del tiempo en medio LB (A) y en medio mínimo con L-aminoácidos 0,6 mM (B). En los paneles B y D se presenta la adhesión de los mutantes *cbrB* (MPO406), *ntrC* (MPO201), *cbrBntrC* (MPO400) y *fleQ* relativa a la de la estirpe de *P. putida* KT2442 silvestre, cultivadas en un medio LB (barras negras) o medio mínimo con L-aminoácidos 0,6 mM (barras blancas), tras 8,5 horas de incubación (formación, panel C). o tras 24 horas de incubación (dispersión, panel D).

4.3.4.2. Capacidad de agregación

La visualización de un cultivo en fase estacionaria de la estirpe mutante MPO406 evidenciaba un efecto de agregación que hacía que toda la biomasa se depositara en el fondo del tubo en pocos minutos (Figura 32A). Con el objeto de cuantificar este efecto, se realizó un test de sedimentación para las estirpes silvestre y mutante *cbrB* (MPO406), como se describe en el apartado 3.1.5.7. Para ello, se utilizaron cultivos saturados de ambas estirpes en medio LB y se diluyeron a densidad óptica de 1 y se dejaron decantar los cultivos sin agitación durante 30 minutos. La monitorización de la densidad óptica a 600 nm (A_{600}) durante ese tiempo permitió establecer diferencias en la dinámica de

sedimentación de ambas estirpes. Las medidas de densidad óptica permitieron mostrar que, mientras la estirpe silvestre prácticamente no sedimentaba durante el tiempo del ensayo, el mutante *cbrB* (MPO406) mostraba una sedimentación de hasta un 70 % en tan sólo 30 minutos (Figura 31B).

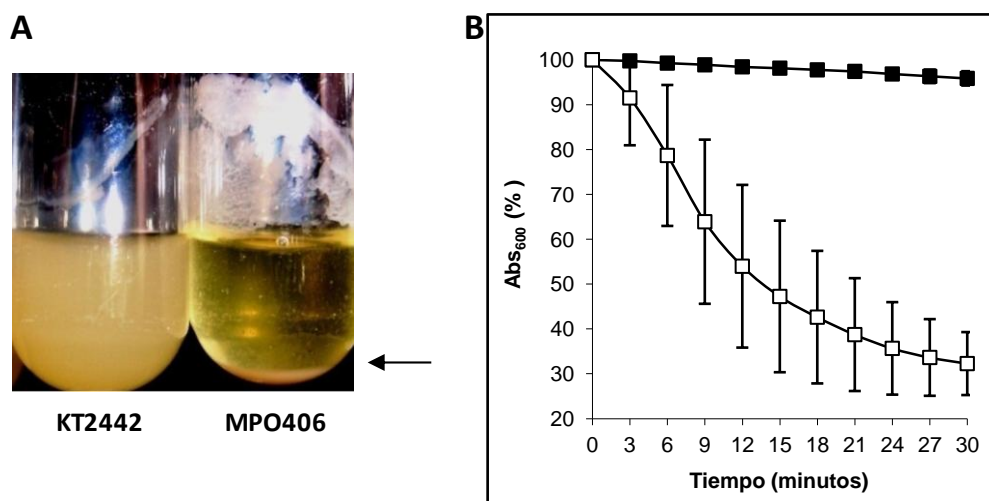


Figura 32. Sedimentación de *P. putida* silvestre y mutante *cbrB* en cultivo estático. A. Cultivo de *P. putida* KT2442 y mutante *cbrB* (MPO406) en LB después de 5 minutos de parar la agitación. Con la flecha se indica el sedimento del mutante. B. Test de sedimentación. Se monitorizó la velocidad de sedimentación de *P. putida* KT2442 (símbolo cerrado) y MPO406 (símbolo abierto) en un cultivo en medio LB sin agitación mediante la medida de la densidad óptica (A_{600}) a lo largo de 30 minutos y se expresó como la relación entre la A_{600} en cada punto relativa a la A_{600} al inicio del ensayo para cada estirpe.

4.4. Capítulo 4. Caracterización de la formación de biofilms del mutante *cbrB* (MPO406).

Se realizó una caracterización más detallada del proceso de formación y dispersión de biofilms en el mutante MPO406. Para ello se diseñaron básicamente dos grupos de experimentos: unos encaminado a discriminar la existencia de biofilms en la interfase aire-líquido y un segundo grupo dirigido a caracterizar la formación de biofilms en cultivo continuo.

4.4.1. Identificación de la formación de biofilms en la interfase líquido-gas

Con esta estrategia se caracterizó la capacidad de las estirpes silvestre y mutante (MPO406) de formar biofilms en la interfase aire-líquido y estudiar su naturaleza según su resistencia a diversos compuestos enzimáticos. Para ello se sembraron placas de medio LB con ambas estirpes y se incubaron durante 3 días a 30 °C (apartado 3.1.5.3 de materiales y métodos) (Gjermansen y col., 2010) y se analizó la cantidad de biofilm formado en ese tiempo para ambas estirpes. Los resultados mostraron que el mutante *cbrB* (MPO406) formaba una película consistente y estable, mientras que la estirpe silvestre no la producía (Figura 33).

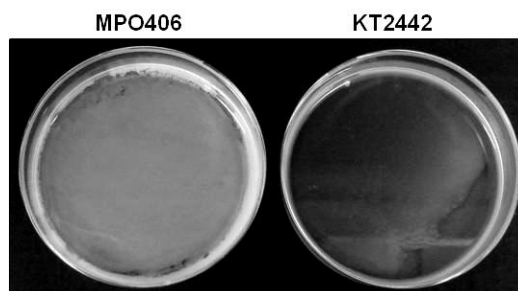


Figura 33. Formación de películas en el *P. putida* KT2442 y en el mutante MPO406. Las estirpes se cultivaron en un medio LB en estático durante 3 días a 30 °C según lo descrito (Gjermansen y col., 2010), y se eliminó el sobrenadante.

En distintas bacterias se ha descrito que los exopolímeros de tipo celulosa podrían jugar un papel importante en la formación de biofilms (Amikam y Benziman, 1989; Wong y col., 1990; Zogaj y col., 2001; Spiers y col., 2003). Para estudiar la composición del biofilm formado por el mutante MPO406, se trató con diversos agentes enzimáticos como la celulasa, metaperyodato de sodio, proteinasa K y DNasa I. La celulasa rompe los polímeros de tipo celulosa, el metaperyodato rompe los enlaces carbon-carbono de los anillos carbonados de los polisacáridos, la proteinasa K atacaría al componente proteico del biofilm, y la DNasa degradaría el DNA que pudiera formar parte de la matriz que lo compone. Para realizar estos tratamientos, se lavaron los biofilms formados a lo largo de los 3 días con sus respectivos tampones, lo que provocó un fraccionamiento de las películas, como se muestra en la figura 34A, y se incubaron durante dos horas con cada uno de los reactivos. Los controles negativos para los tratamientos con celulasa, proteinasa K y DNasa I consistieron en una placa sin tratar, mientras que en el tratamiento con metaperyodato el control negativo incluía la adición de glucosa como inhibidor. Los paneles A y B de la figura 34 muestran el aspecto de las placas de la estirpe MPO406 antes y después del tratamiento (2h).

Como se observa en la figura 34, el tratamiento con DNasa I no afectó a la película producida por el mutante MPO406, sugiriendo que bien la concentración es insuficiente, o bien que el DNA no constituye un elemento estructural indispensable para la formación de esta película. En el caso del tratamiento con celulasa, la película se disolvió tanto en presencia como en ausencia de celulasa, quizás debido a la naturaleza ácida del tampón empleado (acetato de sodio pH 5,0). Las películas parecían ser sensibles en cierta medida al tratamiento con proteinasa K y metaperyodato, lo que sugería que el componente proteico y el componente polisacárido podrían ser importantes en la estructura la película producida por el mutante MPO406.

La sensibilidad del biofilm del mutante MPO406 a metaperyodato puede indicar la mayor presencia de polisacáridos en la matriz que lo compone. La disolución parcial del biofilm en presencia de proteinasa K sugiere un alto contenido proteico.

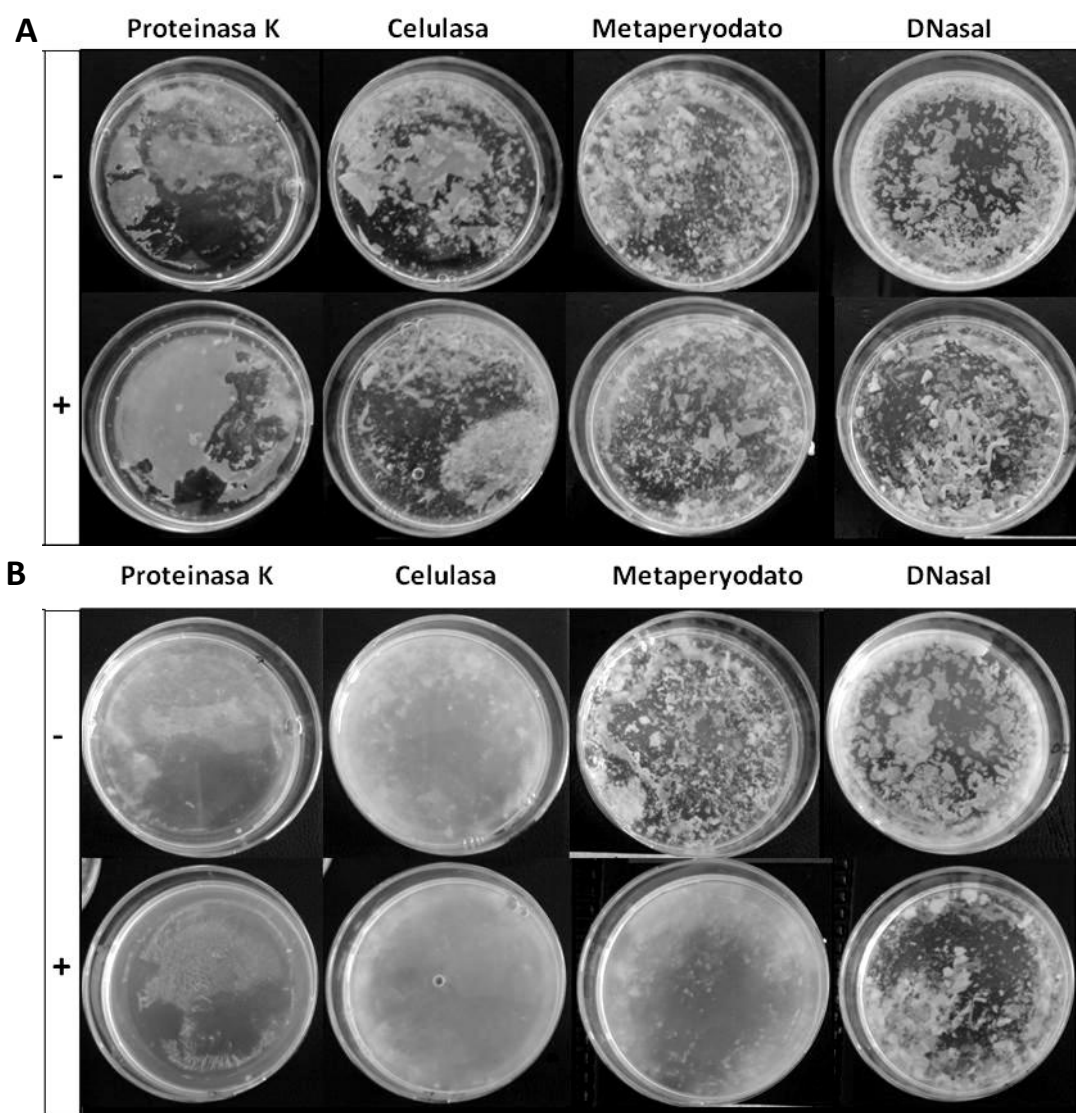


Figura 34. Tratamiento enzimático de un biofilm en el mutante MPO406. Las estirpes se cultivaron en un medio LB en estático durante 3 días y el biofilm formado se trató con Proteinasa K 1mg/ml, celulasa 500 µg/ml, metaperyodato de sodio 40 mM (equilibrado con glucosa 41 mM en el control) y DNasa I 50 µg/ml. Se muestran las películas formadas por el mutante MPO406 al cabo de tres días tras lavado con el correspondiente tampón a tiempo cero (A), y tras 2 horas de tratamiento enzimático (B). Los controles negativos se indican con un signo negativo (ver texto).

Para completar el análisis anterior, se realizó un estudio de la resistencia a proteinasa K y metaperyodato de los biofilms de las estirpes silvestres y mutante *cbrB* cultivadas en microplacas y en agitación, transcurridos distintos tiempos de formación (1, 3 o 5 horas), como se describe en el apartado 3.1.5.2. Esto implicaba una distinta maduración de los biofilms que podía reflejar alguna diferencia en la organización del mismo entre las estirpes. En la Figura 35 se muestran los datos de biofilm en biomasa (medido como Abs₆₂₀, cuyos datos se usaron para calcular el porcentaje de biomasa que se presentan en la tabla 8.

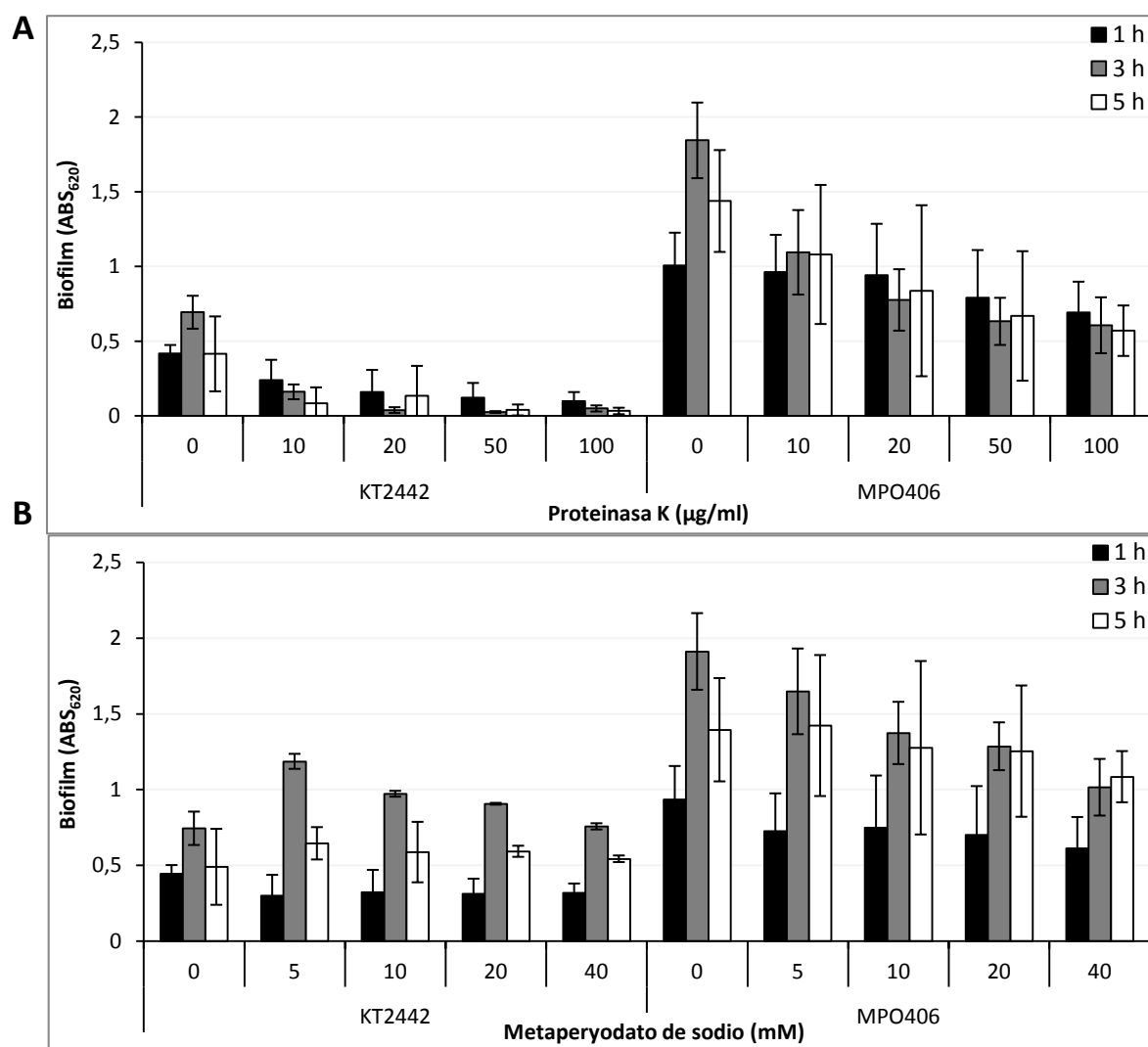


Figura 35. Tratamiento de los biofilms de las estirpes silvestre y MPO406 con Proteínasa K (Panel A) y metaperyodato sódico (Panel B) en microplaca. Se cultivaron biofilms de *P. putida* KT2442 silvestre y mutante durante 1 (barras negras), 3 (barras grises) y 5 horas (barras blancas) y se cuantificó el biofilm tras 1 hora de tratamiento con 0-100 µg/ml de Proteínasa K (A) o Metaperyodato 0-40 mM (B) por medida de la absorbancia a 620 nm.

La adición de proteínasa K a una concentración de 10 µg/ml ocasionó un descenso considerable en la cantidad de biofilm formado por la estirpe silvestre. Este efecto se hizo más evidente transcurridas 3 horas. La adición de proteínasa K a concentraciones superiores a 50 µg/ml supuso la dispersión completa de los biofilms para esta estirpe. El metaperyodato sin embargo no produjo efecto notorio en la biomasa. En el caso del mutante MPO406, ni la adición de proteínasa K ni de metaperyodato consiguió dispersar por completo el biofilm existente.

En la tabla 8 se representa la variación en la cantidad de biofilm formado por las estirpes silvestre y mutante MPO406 en respuesta a los tratamientos con Proteínasa K y metaperyodato sódico, referido a las respectivas estirpes sin tratamiento.

El análisis de biofilms producidos por el silvestre indica que un biofilm temprano (1 h) es más resistente al tratamiento con proteinasa K que los más maduros (3 ó 5 h), en los que se observa un mayor efecto de la proteinasa K. La adición de la concentración más baja de proteinasa K (10 µg/ml) provocó una disminución del 43 % en el biofilm temprano mientras que los biofilms más avanzados (3 o 5 h) se redujeron un 80 %. Al emplear 100 µg/ml proteinasa K, la estirpe silvestre redujo el biofilm temprano en un 76 % (1 h) y los maduros en más de un 90 %. En el mutante MPO406 se observa de nuevo una mayor sensibilidad de los biofilms más maduros; sin embargo, el mutante fue claramente más tolerante al tratamiento que la estirpe silvestre en todas las concentraciones utilizadas. En definitiva, estos resultados indican que la proteinasa K es más efectiva en biofilms maduros, y que la estirpe mutante es más resistente a este tratamiento que la silvestre, probablemente por la composición del biofilm.

Por otra parte, el tratamiento con metaperyodato sódico no afectó sustancialmente la consistencia del biofilm formado por la estirpe silvestre. De hecho, a tiempos largos, se produjo más biofilm con el tratamiento. Sin embargo, en el caso del mutante, la adición de metaperyodato sódico resultó en una reducción pequeña pero consistente de la estructura del biofilm. Estos datos sugerirían que el mantenimiento de la estructura del biofilm silvestre se basa mayoritariamente en interacciones proteicas, mientras el biofilm producido por el mutante *cbrB* tiene además un componente estructural polisacárido.

		MPO406			KT2442		
		1 h	3 h	5 h	1 h	3 h	5 h
Proteinasa K (µg/ml)	0	100±21,8	100±13,8	100±23,7	100±13,7	100±15,9	100±60,3
	10	95,6±24,7	59,4±15,3	75,1±32,3	57,4±32,6	23,3±7,1	20,4±25,7
	20	93,6±34,1	42,1±11,1	58,3±39,8	38,5±35,3	5,7±2,8	32,7±48
	50	78,5±31,8	34,3±8,5	46,5±30,1	29,4±23,6	3,8±0,9	9,8±8,8
	100	68,8±20,4	32,9±10,1	39,7±11,7	23,7±14,7	7,3±3	8,1±5,2
Metaperyodato de sodio (mM)	0	100±20	100±23,4	100±30,7	100±28,3	100±18,2	100±52,9
	5	77,5±13	86,2±15	102±30,3	67,6±25,3	159,4±21	131,7±33,4
	10	80,0±11,1	71,9±17,4	91,5±30,1	72,5±32,9	130,6±28	119,9±31
	20	75,1±10,4	67,3±10,4	89,9±29,3	70,4±36,6	121,8±23	121,0±25
	40	65,4±9,6	53,1±11	77,8±37,2	71,6±36,2	101,7±18	110,9±37,9

Tabla 8. Cuantificación de los biofilms de *P. putida* y mutante MPO406 después de un tratamiento con Proteinasa K y Metaperyodato de sodio. Se calculó el porcentaje de biofilm de MPO406 y *P. putida* KT2442 transcurridas 1, 3 ó 5 horas de incubación, tras el tratamiento con Proteinasa K (0-100 µg/ml) o Metaperyodato de sodio (0-40) mM durante 1 hora.

4.4.2. Caracterización de la formación de biofilms en cámaras de flujo

Los análisis de formación de biofilms en microplaca descritos anteriormente, permitieron identificar un fenotipo de superformación y ausencia de dispersión de los biofilms en la estirpe MPO406. Sin embargo, en este tipo de ensayos y durante la formación del biofilm se produce un agotamiento de los nutrientes, que provoca naturalmente la dispersión del biofilm. Con el objeto de evitar este fenómeno y caracterizar la dinámica de formación de biofilms en las estirpes silvestre y mutante MPO406 a lo largo del tiempo, se procedió a realizar estudios de adhesión, maduración y dispersión de células de ambas estirpes a una superficie mediante su monitorización en cultivo continuo gracias al sistema de cámaras de flujo continuo, donde existe una reposición periódica de nutrientes. Se empleó el sistema descrito por (Tolker-Nielsen y Sternberg, 2011) según se detalla en el apartado 3.1.5.1 de materiales y métodos.

4.4.2.1. Caracterización de la dinámica de adhesión celular y maduración del biofilm en condiciones estándar

Con el fin de identificar diferencias en la formación de biofilms por las estirpes silvestre y MPO406, se realizó un marcaje en el cromosoma con la proteína fluorescente Gfpmut3, que se expresa de forma constitutiva. A continuación se monitorizó la formación de los biofilms a tiempo real en el sistema de flujo acoplado a un sistema de microscopía confocal, haciendo posible así el estudio de la dinámica de formación, maduración o dispersión de biofilms, como había sido descrito previamente (Tolker-Nielsen y Molin, 2000; Tolker-Nielsen y Sternberg, 2011).

El marcaje de las estirpes con la proteína fluorescente se realizó utilizando el plásmido pMPO1226, en el que el gen que codifica la GFP se encuentra flanqueada por los extremos R y L del transposón Tn7. La integración del fragmento contenido entre ambos extremos se produce en un sitio único del cromosoma aguas abajo del gen *glmS*, (PP5499) en *P. putida*, y es estable (Lambertsen y col., 2004). Las imágenes obtenidas por microscopía confocal representan la formación de biofilms en los tres ejes: eje X, ancho, Y largo de la imagen y el eje Z que es la altura del biofilm. Las imágenes se tomaron como secciones XY a diferentes alturas (eje Z) del biofilm, en μm . El eje Z se representa en el subpanel de cada imagen, donde se representa la altura (eje Z) desde el punto de observación (cubreobjetos), como se muestra en la figura 36.

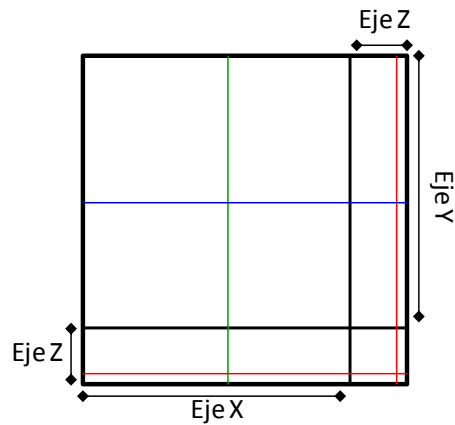


Figura 36. Visualización de una imagen de microscopía confocal XYZ. Se muestran los ejes X, Y de una imagen tomada con microscopía confocal, tomadas a una altura (Z) determinada. En esta imagen se integran todas las secciones XY tomadas a las distintas alturas (Zs). En cada imagen se muestra una sección, en una posición dada X (verde), Y (azul) y a una altura determinada (rojo).

Las estirpes MPO425 y MPO444 correspondientes al marcaje con GFP de las estirpes silvestre y mutante MPO406, respectivamente, fueron inoculadas por separado en cámaras de flujo usando como medio de cultivo LB 2% y se monitorizó su dinámica de formación de biofilms durante 72 horas. Como se muestra en la figura 37, la estirpe silvestre formaba estructuras de biofilm inestables y con menor cobertura de sustrato, incluso al cabo de las 72 horas. Por el contrario, la estirpe mutante era capaz de formar microcolonias al cabo de tan solo 24 horas, y a partir de éstas colonizaba la mayoría del sustrato. Así, al cabo de 72 horas, el mutante había construido un biofilm de alta cobertura (XY) y grosor (Z), que se mantenía a lo largo del tiempo. El estado de maduración del biofilm mutante nunca fue alcanzado por la estirpe silvestre durante las 72 horas de monitorización del biofilm.

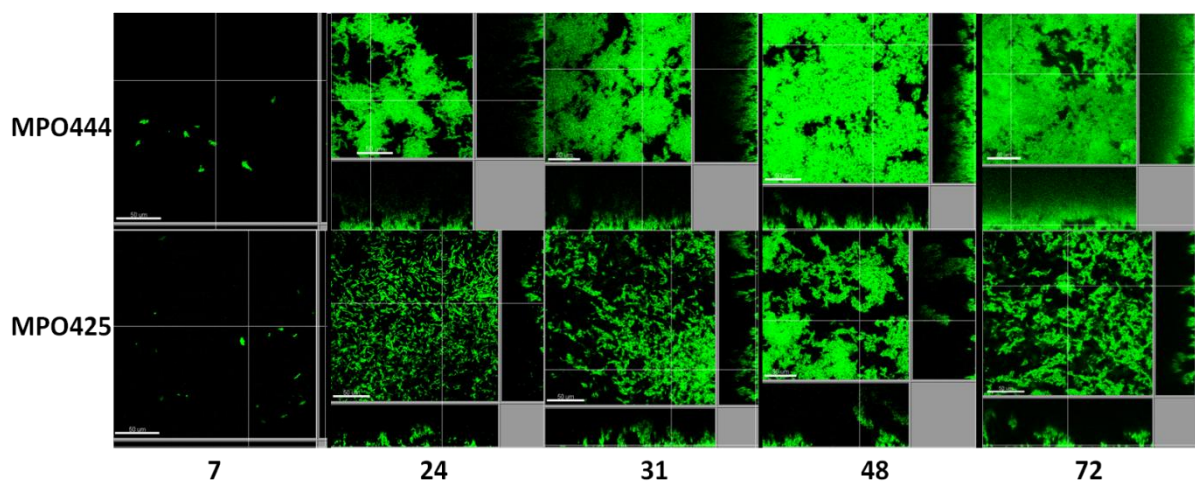


Figura 37. Dinámica de formación de biofilms en cámaras de flujo. Se presenta el ciclo de formación de biofilm de *P. putida* KT2442 silvestre (MPO425; panel inferior) y mutante *cbrB* (MPO444; panel superior) en medio LB 2%. Se capturaron imágenes transcurridas 7, 24, 31, 48 y 72 horas desde la inoculación.

4.4.2.2. Caracterización de la dinámica de adhesión celular y maduración del biofilm en presencia de SDS

Con el objeto de estudiar diferencias en la composición de la matriz del biofilm en las estirpes silvestre y mutante *cbrB* marcadas en el cromosoma (MPO425 y MPO444, respectivamente), se analizó el efecto de la adición de un detergente como el dodecilsulfato sódico (SDS) sobre la integridad de los biofilms. El SDS desnaturaliza proteínas y disuelve membranas celulares, y permite hacer una estimación cualitativa de los biofilms y la matriz que los constituyen. Se utilizaron dos concentraciones de SDS para visualizar los biofilms al microscopio confocal, y se midió la viabilidad de las células que lo componen mediante adición de yoduro de propidio (IP). IP tiñe las células muertas en rojo, mientras que las células vivas permanecen verdes por la expresión de Gfp. Se monitorizó el efecto de la adición de SDS 0,1% sobre la formación de un biofilm temprano, transcurridas 3, 22 y 27 horas. Se observó que en estas condiciones la compactación de las microcolonias de la estirpe mutante se veía afectada, aunque las células aún permanecían agregadas. Sin embargo, el biofilm de la estirpe silvestre se dispersó completamente al cabo de 27 horas (Figura 38). Estos datos podrían indicar que aunque el componente proteico es importante en el mutante, hay otros elementos responsables de la consistencia del biofilm temprano que produce el mutante MPO444. Sin embargo, en el silvestre la mera presencia de SDS es suficiente para dispersar las microcolonias de 24 horas.

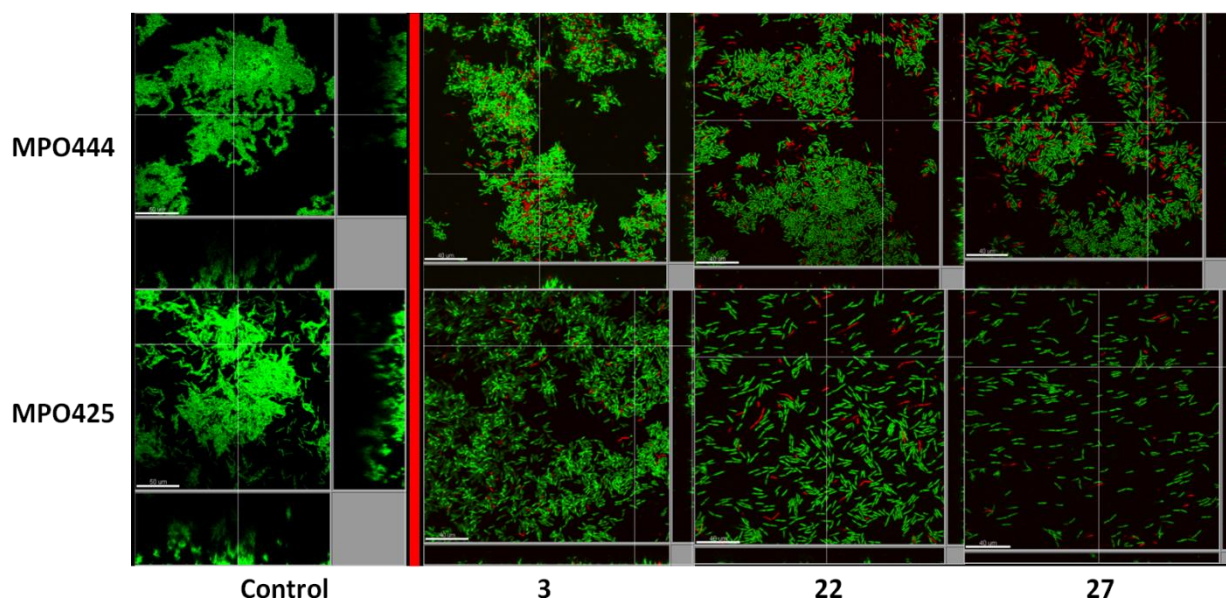


Figura 38. Tratamiento con SDS 0,1 % de biofilms tempranos. Se presenta el efecto de la adición de SDS 0,1 % en el desarrollo de biofilms tempranos de *P. putida* KT2442; MPO425 (panel inferior) y el mutante MPO444 (panel superior) en medio LB 2%. Como control se usaron biofilms de 24 horas de vida y se monitorizó el efecto de la adición de SDS tras 3, 22 y 27 horas.

4.4.2.3. Caracterización de la dinámica de dispersión del biofilm por limitación de nutrientes y/o oxígeno

Para caracterizar el proceso de dispersión del biofilm en las estirpes silvestre y mutante MPO444, se interrumpió la aportación de nutrientes y/o oxígeno transcurridas 72 horas tras la inoculación de las estirpes en la cámara de flujo. Se observó que en la estirpe silvestre, la dispersión del biofilm comenzaba tras 30 minutos sin flujo, y transcurridas 24 horas había dispersado su biofilm completamente y sólo se observaban células sueltas (panel inferior, figura 39). Sin embargo, el biofilm del mutante MPO444 en el mismo periodo de tiempo conservaba su integridad (panel superior, figura 38). Estos resultados evidencian una resistencia del mutante al proceso de dispersión por cese del suministro de nutrientes u oxígeno, que podría ser causado por una insensibilidad a cambios en el estado metabólico de la célula, o por la presencia de una matriz extracelular de composición diferente. La causa de esta resistencia será estudiada con mayor detalle en apartados siguientes.

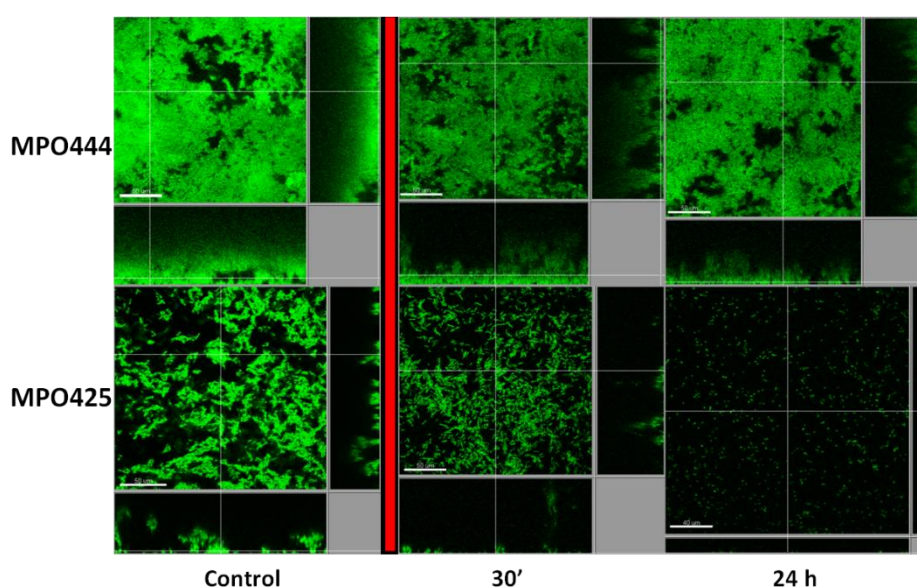


Figura 39. Dispersión de biofilms en cámaras de flujo por cese del suministro de flujo. Se presenta la comparación de dispersión de biofilm de *P. putida* KT2442 silvestre (MPO425) y mutante *cbrB* (MPO444) en medio LB 2% usando como referencia biofilms de ambas estirpes de 72 horas y con toma de imágenes a los 30 minutos y 24 horas desde la interrupción del flujo del medio. En el panel superior se muestra el mutante MPO444 y en el panel inferior la estirpe silvestre.

4.4.2.4. Caracterización de la dinámica de dispersión del biofilm en presencia de agentes químicos o antibióticos

Mientras que en el apartado 4.2.2 se analizaba el proceso de maduración del biofilm en presencia de SDS (cuando se añade a biofilms jóvenes), en este apartado se analizó el efecto de

agentes químicos o antibióticos sobre biofilms maduros, y por tanto, sobre el proceso de dispersión del biofilm. Como agente químico se usó SDS a concentración 0,01 y 0,1 % debido a la alta resistencia a dispersión observada en el mutante *cbrB*. Como agente antibiótico se utilizó colistina, un antibiótico peptídico del grupo de las polimixinas efectivo en bacterias Gram negativas y ampliamente utilizado en bacterias multirresistentes como *P. aeruginosa* y *Acinetobacter* (Levin y col., 1999; McPhee y col., 2003; Kasiakou y col., 2005; Haagenzen y col., 2007)

Para caracterizar el efecto del SDS sobre biofilms maduros se procedió de la misma manera que en el apartado 4.2.2 pero añadiendo el SDS a un biofilm de 72 horas. Aunque la estructura y cobertura del biofilm mutante no se vio afectada tan siquiera a las 24 horas del tratamiento, su viabilidad se vio comprometida y al cabo de las 24 horas resultaba en un biofilm inerte con una capa superior de células vivas (Figura 40). Sin embargo, el biofilm de la estirpe silvestre no resultó alterado ni en estructura ni en viabilidad. Estos datos apuntarían a una diferencia en la composición de la membrana o envuelta celular entre ambas estirpes que conllevaría a una mayor sensibilidad en el mutante.

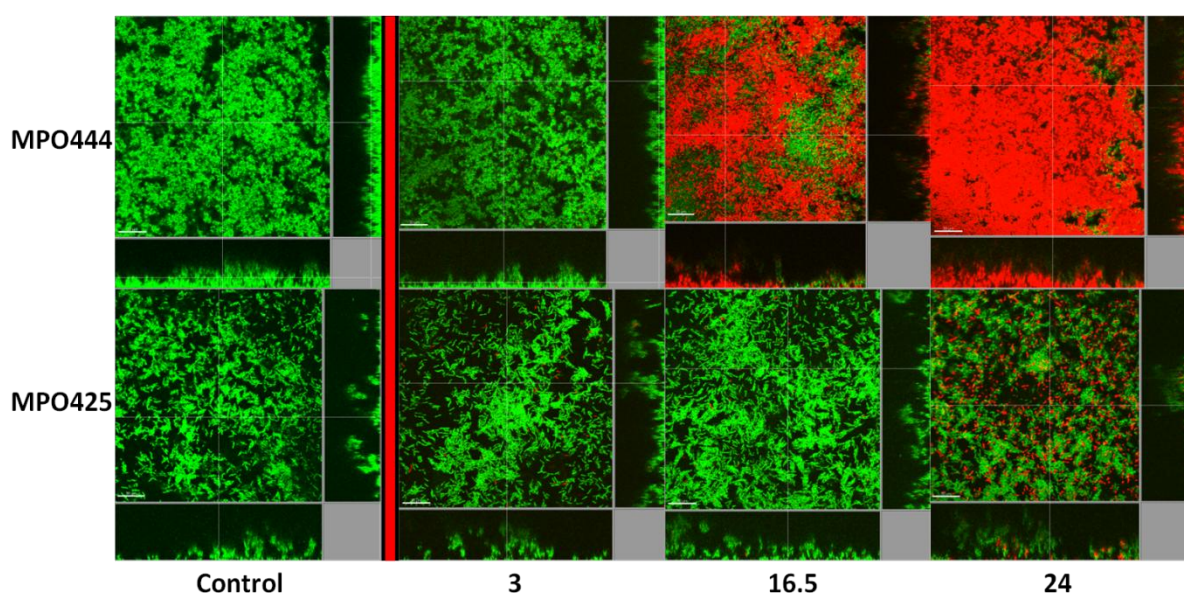


Figura 40. Efecto de la adición de SDS 0,01 % sobre biofilms maduros. Se compara el efecto de la adición de SDS 0,01 % sobre biofilms de 72 horas de vida de *P. putida* KT2442 silvestre (MPO425) y el mutante *cbrB* (MPO444) en medio LB 2%. En el panel superior se muestra el mutante MPO444 y en el panel inferior la estirpe silvestre sin adición de SDS (control) y tras 3, 16,5 y 24 horas de la adición de SDS 0,01 %.

Cuando se añadió una concentración diez veces superior de SDS se observó un efecto contrario. Como se muestra en la Figura 41 (panel superior), el biofilm del mutante se mantenía intacto y además se hacía resistente a SDS a lo largo del tiempo. Sin embargo, el biofilm de la estirpe silvestre se dispersaba a alta concentración de SDS. Estos datos podrían indicar que el biofilm del silvestre posee una matriz extracelular de componente proteico mayoritariamente.

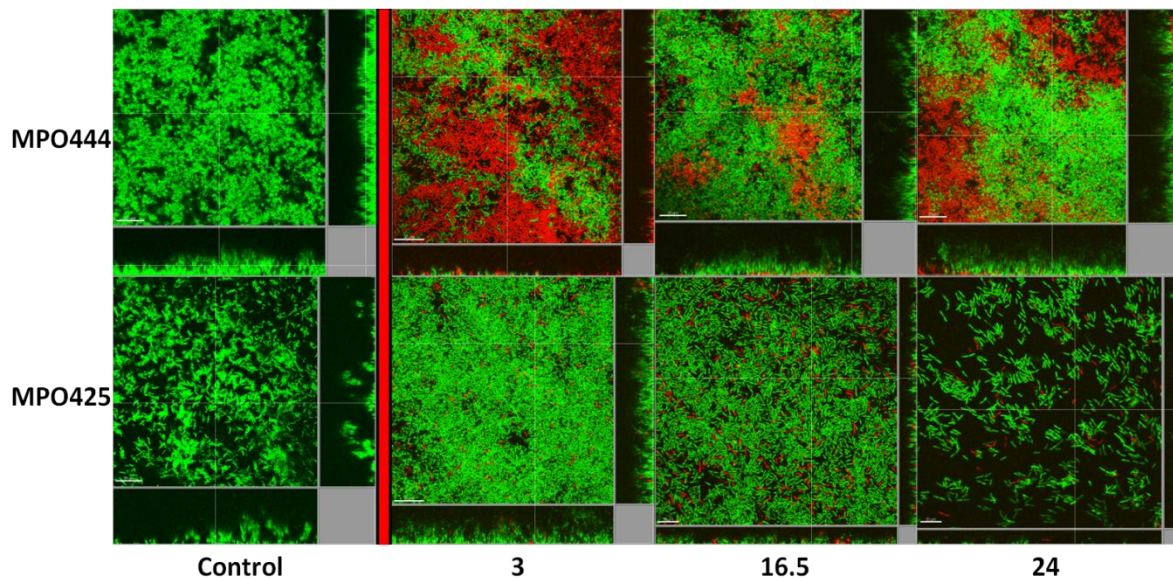


Figura 41. Efecto de SDS 0,1 % sobre biofilms maduros. Se compara el efecto de la adición de SDS 0,1 % sobre biofilms de 72 horas de vida de *P. putida* KT2442 silvestre (MPO425) y mutante *cbrB* (MPO444) en medio LB 2%. En el panel superior se muestra el mutante *cbrB* y en el panel inferior la estirpe silvestre sin adición de SDS (control) y tras 3, 16,5 y 24 horas de la adición de SDS 0,1 %.

Para estudiar la respuesta del biofilm a un tratamiento con antibiótico, se determinó experimentalmente la concentración mínima inhibitoria (MIC) de colistina para la estirpe silvestre (MPO425) y mutante *cbrB* (MPO444) para un cultivo planctónico. La MIC en ambos casos resultó ser de 0,05 $\mu\text{g/ml}$. Puesto que los cultivos a tratar se encontraban formando biofilms y no eran realmente células en suspensión, se utilizó una concentración de colistina 10 ó 20 veces superior a la MIC para los ensayos en cámaras de flujo, y se monitorizó su efecto transcurridas 3 y 24 horas de su adición. La monitorización de células muertas se realizó mediante la adición de yoduro de propidio.

Como se muestra en la figura 42, el tratamiento del biofilm del mutante MPO444 con una concentración de colistina 10 veces superior a la MIC, causaba la muerte de la capa superior del biofilm, mientras que la mayoría del biofilm permanecía vivo y su estructura y cobertura inalterada. . En el caso del tratamiento con colistina del biofilm producido por la estirpe silvestre, se observó un biofilm que aparecía más plano (ver eje Z) transcurridas tres horas, quizá en forma de monocapa. Sin embargo, el biofilm se recuperó y se mantuvo a las 24 h, de forma similar al control sin tratar, aunque con una fracción de la población muerta por la colistina.

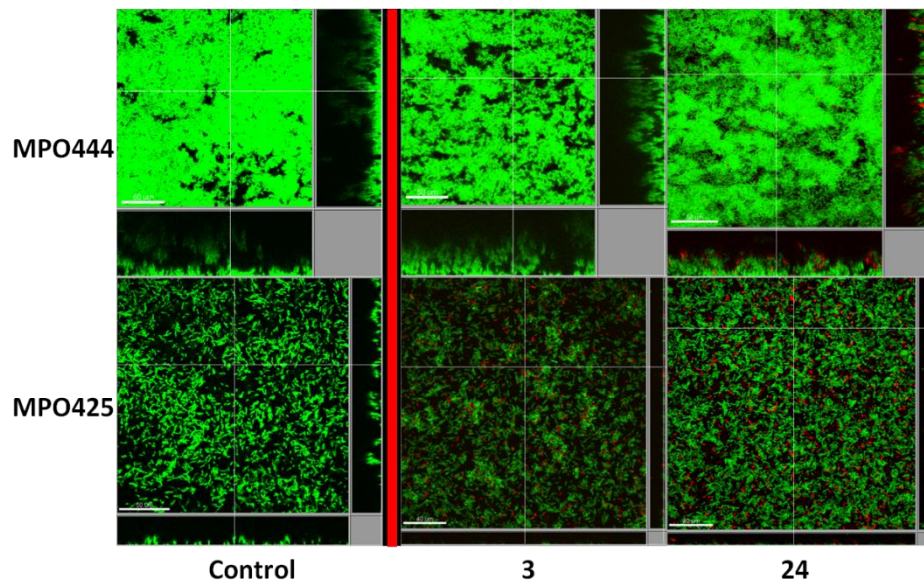


Figura 42. Tratamiento de biofilms maduros con colistina 0'5 µg/ml. Se compara el efecto de la adición de colistina 0.5 µg/ml sobre biofilms de 72 horas de vida de *P. putida* KT2442 y MPO444 en medio LB 2%. En el panel superior se muestra la estirpe MPO444 y en el panel inferior la estirpe silvestre en ausencia de colistina (control) y transcurridas 3 y 24 horas de la adición de colistina.

Cuando se trataron los biofilms de ambas estirpes a una concentración de colistina 20 veces superior a la MIC, se observó un efecto similar a lo descrito anteriormente. El mutante MPO444 presentó la capa superior del biofilm inerte y más gruesa, mientras que la mayoría del biofilm debajo de ella permanecía vivo y su estructura y cobertura inalterada (Figura 43). En el caso de la estirpe silvestre, la viabilidad del biofilm se vio comprometida y al cabo de 24 horas el biofilm estaba constituido por células muertas.

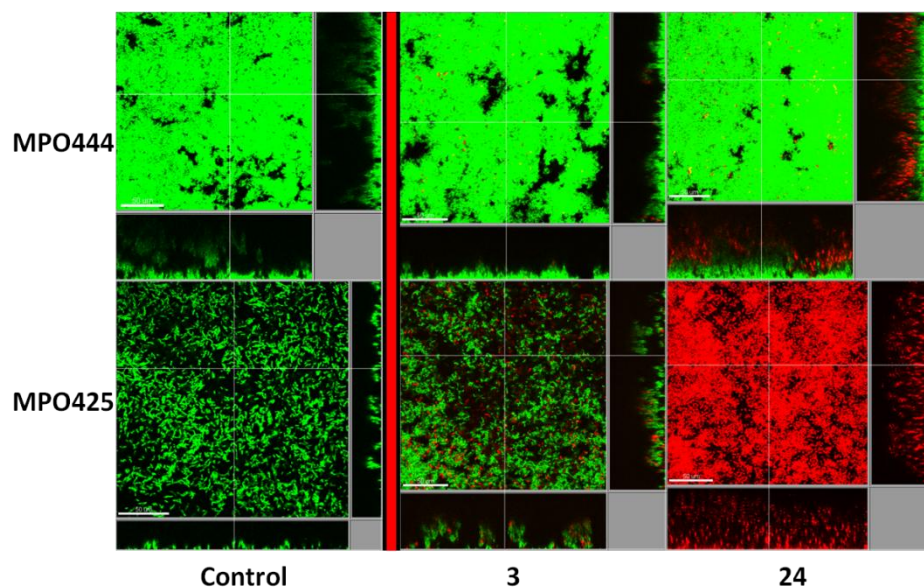


Figura 43. Tratamiento de biofilms maduros con colistina 1 µg/ml. Se compara el efecto de la adición de colistina 1 µg/ml sobre biofilms de 72 horas de vida de *P. putida* KT2442 silvestre (MPO425) y el mutante *cbrB* (MPO444) en medio LB 2% . En el panel superior se muestra el biofilm formado por la estirpe mutante MPO444

y en el panel inferior el biofilm formado por la estirpe silvestre en ausencia de colistina (control) y transcurridas 3 y 24 horas de la adición de colistina.

Las diferencias encontradas en la formación de biofilm de ambas estirpes a alta o baja de concentración de SDS o colistina sugieren que ambas estirpes probablemente poseen una composición diferente de la matriz extracelular, y que la difusión de sustancias a través de la matriz está dificultada en el mutante.

4.4.3. Ensayos de competencia en cultivo mixto del mutante *cbrB* (MPO406) frente a la estirpe silvestre

Hasta el momento, las aproximaciones realizadas en cámaras de flujo permitían describir que el biofilm formado por el mutante MPO406/MPO444 era más robusto e inalterable por efecto de agentes químicos o antibióticos o por una limitación de nutrientes o suministro de oxígeno. Los distintos tratamientos podían comprometer la viabilidad del biofilm en la estirpe mutante, pero no su estructura. Se optó entonces por realizar ensayos de competencia para colonizar la superficie sólidas entre las dos estirpes en cámaras de flujo. Por ello, se co-inocularon las estirpes en distintas proporciones, marcadas cada una de ellas con un marcador fluorescente (YFP y CFP) para poder hacer un seguimiento de la colonización durante la formación del biofilm. Las estirpes empleadas en estos ensayos fueron MPO426 (estirpe silvestre marcada con la FP cyan; Cfp), MPO427 (estirpe silvestre marcada con la FP amarilla; Yfp), MPO445 (estirpe MPO406 marcada con la FP cyan; Cfp) y MPO446 (estirpe MPO406 marcada con la FP amarilla, Yfp), y se comparará la capacidad para colonizar la cámara de flujo dos a dos: MPO426 vs MPO446 y MPO427 vs. MPO445.

4.4.3.1. Determinación de la capacidad de colonización del sustrato por las estirpes silvestre y mutante *cbrB* (MPO406).

Para ello, se co-inocularon ambas estirpes en una proporción de 1:1 en una cámara de flujo, y se visualizó el biofilm transcurridas 12 h tras la inoculación. En la figura 43 se muestra que transcurridas 12 horas desde la inoculación, el biofilm formado estaba compuesto por microcolonias de las dos estirpes en similar proporción. Además, se comprobó que las microcolonias observadas resultaron clonales, y no se detectaban colonias mixtas. Sin embargo, transcurridas 32 horas se observó que la mayor parte del biofilm había sido formado a partir de la estirpe mutante, y que la estirpe silvestre había resultado totalmente desplazada por la primera. Este resultado se obtuvo de igual manera cuando se efectuó un intercambio de marcadores fluorescentes entre las estirpes (Figura 44, panel inferior). Además se observó que el biofilm formado por la estirpe mutante mantenía su resistencia a la dispersión tras interrumpir el suministro del flujo de nutrientes (datos no mostrados).

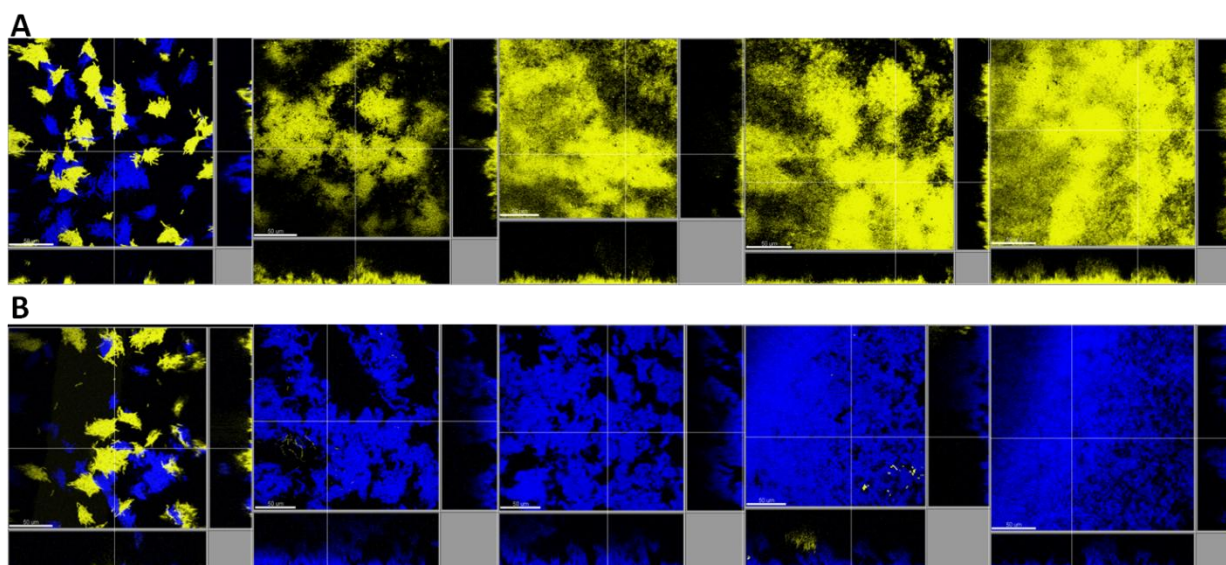


Figura 44. Ensayo de competencia en la colonización de biofilms en un cultivo mixto en proporción 1:1 (silvestre: *cbrB*). Las estirpes *P. putida* KT2442 silvestre y mutante *cbrB* se inocularon en proporciones iguales en cámaras de flujo en medio LB 2%. Se monitorizó la eficiencia en la formación de biofilms de ambas estirpes monitorizando a las 12, 32, 45, 54 y 72 horas, de izquierda a derecha. En el panel A se muestra el biofilm de *P. putida* KT2442 marcada con Cfp (MPO426, azul) vs. MPO406 marcada con Yfp (MPO446, amarillo) y en el panel B la estirpe *P. putida* KT2442-Yfp (MPO427, amarillo) vs. MPO406- Cfp (MPO427, azul).

4.4.3.2. Determinación de la capacidad de colonización del sustrato de la estirpe *cbrB* (MPO406) en proporción celular inferior con respecto a la silvestre

De la misma manera que en el apartado anterior, se co-inocularon ambas estirpes marcadas diferencialmente en una única cámara de flujo. En esta ocasión la proporción entre las estirpes silvestre:mutante fue de 9:1. Transcurridas 32 horas tras la inoculación, se observó que la mayor parte de la superficie había sido colonizada por el biofilm de la estirpe mutante. De nuevo, el intercambio de marcadores fluorescentes entre las estirpes no supuso ninguna diferencia en los resultados (Figura 45). Hay que destacar que la colonización del sustrato por la estirpe mutante era considerable a las 12 horas de la inoculación independientemente de la proporción de las dos estirpes inicialmente.

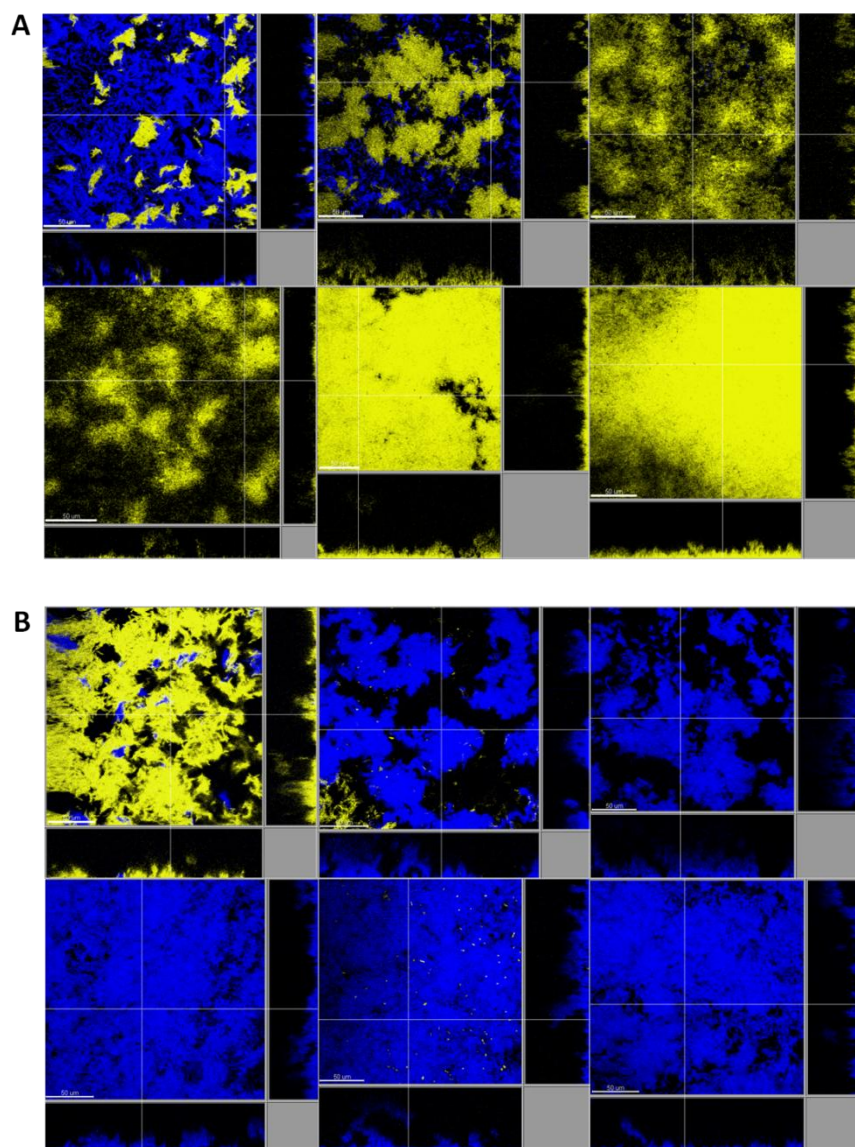


Figura 45. Ensayo de competencia en la colonización de biofilms cultivo mixto en proporción 9:1 (silvestre: MPO406). Las estirpes *P. putida* KT2442 y MPO406 se inocularon en proporción 9:1 en una única cámara de flujo en medio LB 2%. Se monitorizó la eficiencia de formación de biofilms de ambas estirpes cuando crecían en cultivo mixto monitorizando a las 12, 21, 32, 45, 54 y 72 horas. En el panel A se muestra el biofilm de *P. putida* KT2442 marcada con Cfp (MPO426, azul) vs. MPO406 marcada con Yfp (MPO446, amarillo) y en el panel B la estirpe *P. putida* KT2442-Yfp (MPO427, amarillo) vs. MPO406- Cfp (MPO427, azul).

Por otra parte se inoculó en primer lugar la estirpe silvestre (empleando la misma dilución que en el apartado 4.3.1) y transcurridas 24 horas se inoculó la estirpe mutante en igual proporción sin interrumpir el flujo. Se monitorizó la formación de biofilm desde el inicio y durante 48 horas adicionales tras la inoculación del mutante *cbrB*. De nuevo, el mutante consiguió desplazar a la estirpe silvestre, provocando la dispersión de su biofilm y colonizando por completo la superficie (Figura 46).

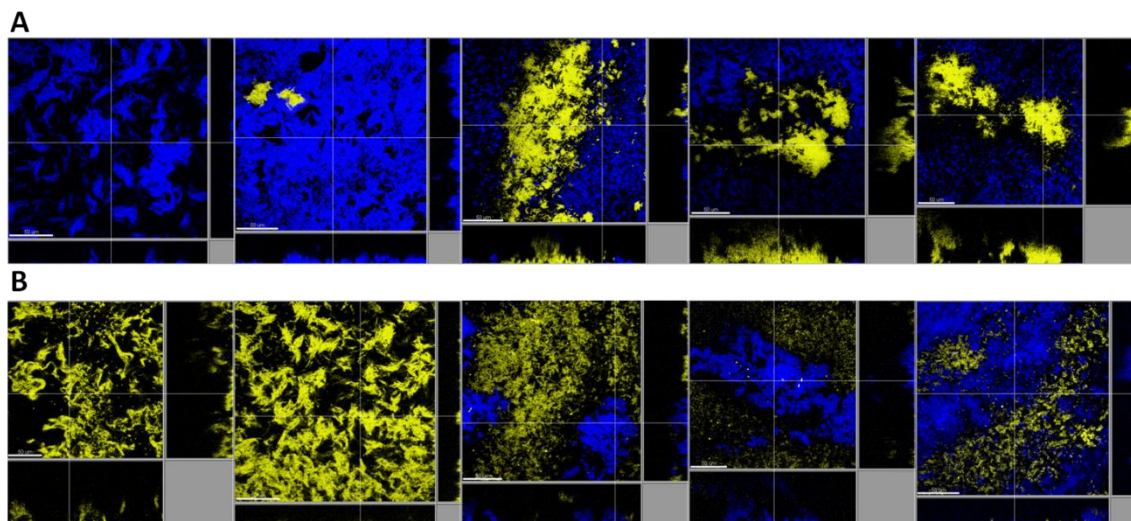


Figura 46. Ensayo de competencia por la colonización de biofilms con una diferencia en la inoculación de la estirpe MPO406 de 24 horas respecto a la estirpe silvestre. Se inoculó la estirpe silvestre KT2442 en una cámara de flujo en medio LB 2%, y transcurridas 24 horas se inoculó la estirpe MPO406. Se usó como imagen de referencia la estirpe silvestre antes de la inoculación y se monitorizaron las cámaras tras 8, 22, 30, y 48 horas (de izquierda a derecha). En el panel A se muestra el biofilm de *P. putida* KT2442 marcada con Cfp (MPO426, azul) vs. MPO406 marcada con Yfp (MPO446, amarillo) y en el panel B la estirpe *P. putida* KT2442-Yfp (MPO427, amarillo) vs. MPO406- Cfp (MPO427, azul).

Además se llevaron a cabo experimentos de *time lapse*, donde se fija un campo de visualización y se realiza la toma de imágenes periódica y de forma automática a lo largo del tiempo, lo cual permite obtener una película de la dinámica del biofilm en tiempo real. En este caso, se monitorizó el campo seleccionado a lo largo de cuatro horas, tomando imágenes cada quince minutos. Las imágenes obtenidas (anexo 2, digital) pusieron de manifiesto que la estirpe silvestre activaba la dispersión en primer lugar, y una vez liberado el sustrato, el mutante *cbrB* era capaz de proliferar y ocuparlo por completo. De este modo se descartaría que la dispersión del silvestre fuera debida a la proliferación del mutante y su consecuente agotamiento local de nutrientes.

De todos los resultados se puede concluir que la eficacia de colonización de una superficie sólida por parte del biofilm de la estirpe mutante MPO406 es claramente superior a la del silvestre. El hecho de que la colonización por parte del mutante ocurra siempre a partir de las 12 horas a partir de la inoculación del mutante, y de forma independiente de la proporción entre las estirpes o del tiempo transcurrido desde la inoculación, sugiere que el mutante podría estar produciendo una señal que provoca la dispersión de la estirpe silvestre.

4.5. Capítulo 5: Construcción de un mutante de delección de *cbrB* ($\Delta cbrB$, MPO401) nulo y comparación con el mutante de inserción (*cbrB::miniTn5luxABKm*, MPO406)

Los análisis de transcriptómica y expresión descritos anteriormente se realizaron utilizando la estirpe silvestre y en el mutante MPO406. Este mutante procede de una colección de mutantes de *P. putida* por inserción, y contiene un minitransposón insertado en el gen *cbrB*. Este minitransposón contiene los genes *luxAB* (de luciferasa) de *Vibrio harveyi* (carentes de su promotor nativo) localizados junto a las secuencias repetidas terminales en una orientación que permite la generación de fusiones a genes u operones. Los extremos I y O (de 19 pb) se encuentran flanqueando el minitransposón Tn5, O junto a los genes *lux*, e I tras el gen de resistencia a kanamicina (de Lorenzo y Timmis, 1994; Kristensen y col., 1995). Este tipo de herramientas son módulos que contienen terminadores de la transcripción aguas abajo del gen de resistencia al antibiótico para evitar la transcripción de los genes aguas abajo desde el promotor del gen de la resistencia al antibiótico (Herrero y col., 1990).

4.5.1. Caracterización y descripción del mutante de inserción MPO406

En primer lugar se procedió a localizar la inserción del minitransposon en el mutante MPO406. Para ello, se amplificaron por PCR las regiones flanqueantes al gen *cbrB* con las siguientes combinaciones de oligonucleótidos (Figura 47):

1. *cbrB*-5 y O-long
2. *cbrB*-6 e I-long
3. *luxA*273 y *cbrB*944
4. *cbrB*-NdeI fwd y *luxA*273
5. *cbrB*-5 y *cbrB*-6

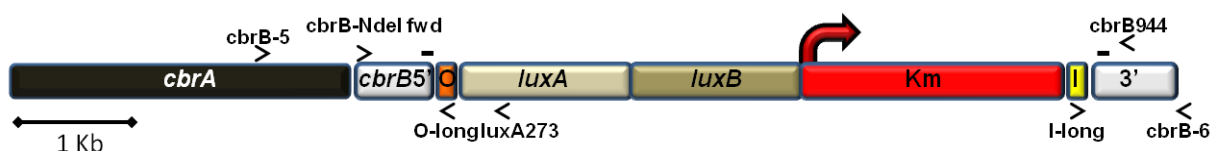


Figura 47. Determinación de la orientación del transposón en la estirpe MPO406 (*cbrB::miniTn5luxABKm*).

Se presenta un esquema de la inserción del mini transposoón *miniTn5luxABKm* en el cromosoma de *P. putida* KT2442. O, extremo O del transposón; *luxAB*, genes de la luciferasa de *Vibrio harveyi*; Km, resistencia a Kanamicina con su propio promotor indicado con la flecha roja; I, extremo I del transposón; 3', extremo 3' del gen *cbrB* (posterior a la inserción). Se muestra además la zona de hibridación de los oligonucleótidos *cbrB*-5, *cbrB*-NdeI fwd, O-long, *luxA*273, I-long, *cbrB*944 y *cbrB*-6 para determinar la orientación.

La orientación del transposón resultó ser la que se muestra en la figura 46, y los genes de la luciferasa *luxAB* se localizaban en el extremo 5' del gen insertado. Además, la secuenciación de los fragmentos amplificados en los extremos del transposón permitió localizar la inserción en el nucleótido 670 de la pauta abierta de lectura del gen *cbrB*, provocando una sustitución del aminoácido histidina 224 (hidrofílico) por leucina (hidrofóbica) e induciendo un cambio en la fase de lectura. Esto conlleva la lectura de 143 nucleótidos de la secuencia del transposón hasta que alcanza un codón de parada. Por tanto añadían 47 aminoácidos a los 223 de CbrB y se generaba un péptido con un tamaño teórico de 29 KDa. La inserción localizaba en el dominio central de CbrB, entre los sitios con actividad ATPasa. El análisis por *Southern blot* confirmó asimismo una organización genómica coherente con la inserción mapeada. Dado que la presencia de un péptido truncado de CbrB, que además contenía el sitio REC de activación por la HK, podía interferir con la cascada de señalización, se procedió a construir un mutante de delección limpio, y realizar una caracterización fenotípica, tal y como se había hecho con el mutante MPO406.

4.5.2. Construcción de un mutante de delección de *cbrB* ($\Delta cbrB$, MPO401) de *P. putida* KT2442

Para la construcción del mutante de delección del gen *cbrB* en *P. putida* se clonaron las regiones flanqueantes izquierda y derecha al gen *cbrB*, y entre ellas, se clonó el gen de resistencia a kanamicina, en un vector no replicativo en *Pseudomonas*. La introducción de este vector en *P. putida* KT2442 permitió seleccionar una estirpe resistente al antibiótico en la que se había producido la sustitución de *cbrB* por el módulo de la kanamicina, tras un doble evento de recombinación homóloga de las regiones flanqueantes (ver materiales y métodos). El mutante se denominó MPO401 y se comprobó que tenía la organización genómica adecuada mediante *Southern blot*.

4.5.3. Caracterización y comparación fenotípica de los mutantes MPO401 ($\Delta cbrB$) y MPO406 (*cbrB::miniTn5luxABKm*)

La construcción del mutante de delección *cbrB*, MPO401, permitió obtener un mutante limpio que carecía de CbrB y en el que no podía existir la forma truncada de la proteína que se había postulado en el mutante de inserción MPO406. La primera observación que distinguía al mutante MPO401 del MPO406 fue que no agregaba ni decantaba la biomasa en un cultivo en fase estacionaria, como se había observado para el mutante MPO406. Por esta razón, y dado que la agregación del mutante MPO406 podría estar relacionada con la capacidad de adhesión a superficies sólidas y formación de biofilms, se procedió a caracterizar este fenotipo para las dos estirpes mutantes (MPO401 y MPO406).

4.5.3.1. Adhesión celular

Se comparó la capacidad de los mutantes MPO401 y MPO406 de adherirse a una superficie sólida, usando como referencia a la estirpe silvestre. Para ello, se realizaron cinéticas de formación de biofilms en cultivo en microplaca, cuantificando el biofilm formado mediante tinción con cristal violeta de la biomasa adherida y midiendo la ABS_{620} . Sorprendentemente, el mutante MPO401 producía niveles de biofilm similares a los de la estirpe silvestre, aunque era sensiblemente más resistente a la dispersión (Figura 48). Estos datos indicaban que CbrB no era responsable de la alta capacidad del mutante MPO406 de formar biofilms, aunque podría estar implicado de alguna manera en la falta de dispersión del mismo cuando se producía el agotamiento de nutrientes en el medio.

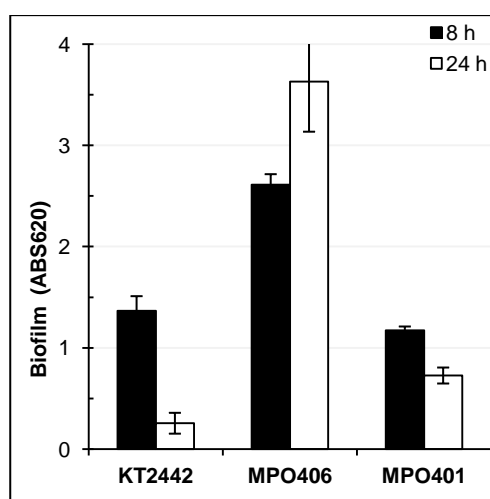


Figura 48. Formación de biofilms por *P. putida* y mutantes *cbrB*. Se midió la cantidad de biofilm como la biomasa adherida a la microplaca teñida con cristal violeta 0,1 % a 620 nm (ABS_{620}) de *P. putida* KT2442, MPO406, y MPO401 tras 8 horas (formación) y 24 h (dispersión) de incubación. Se muestra una de las réplicas biológicas, representativa, con la media de 8 réplicas técnicas, con la correspondiente desviación estándar.

Dado que se había detectado la formación de biofilms como un fenotipo que diferenciaba a los mutantes MPO401 y MPO406, se procedió a caracterizar el resto de fenotipos asociados al mutante MPO406, para el mutante de delección MPO401.

4.5.3.2. Crecimiento en distintas fuentes de carbono y complementación funcional

Se monitorizó el crecimiento de la estirpe silvestre junto a las mutantes MPO406 y MPO401 utilizando LB, succinato, citrato, arginina, tirosina, ornitina, glutámico, prolina e histidina. La fuente de nitrógeno aportada en todos los casos (excepto en medio LB) fue amonio (Tabla 9).

Como se muestra en la tabla 9, se comprobó que el mutante MPO401 ($\Delta cbrB$) utilizaba los compuestos analizados de forma igualmente eficiente que el mutante de inserción MPO406. Los mutantes MPO406 y MPO401 tenían alterada, en mayor o menor medida, la capacidad para utilizar histidina, prolina, arginina, ornitina, glutamato, prolina e histidina y eran totalmente incapaces de usar citrato y tirosina como fuente de carbono, mientras que la estirpe silvestre los utilizaba más eficientemente. El crecimiento en medio LB o en un medio definido que contenía succinato y amonio era equivalente para las tres estirpes. Todos estos resultados indican que el regulador de la respuesta CbrB, es el responsable de capacidad de asimilar los compuestos ensayados como fuente de carbono.

Compuesto	Fuente	KT2442	MPO406	MPO401
Histidina	C	+	+/-	-
Prolina	C	++	+/-	+/-
Arginina	C	++	-	-
Ornitina	C	+	-	-
Tirosina	C	+++	-	-
Glutamato	C	++	+	+
LB	C/N	+++	+++	+++
Succinato	C	+++	+++	+++
Citrato	C	+++	+/-	+/-

Tabla 9. Crecimiento de *P. putida* KT2442 y mutantes *cbrB* en distintas fuentes de carbono. Crecimiento, medido como aumento de la densidad óptica a 600 nm (Abs_{600}) del cultivo en función del tiempo, de *P. putida* KT2442, *P. putida* MPO406 (*cbrB::miniTn5luxABKm*) y *P. putida* MPO401 (*cbrB::Km*) en medio mínimo con amonio como fuente de nitrógeno e Histidina, Prolina, Arginina, Ornitina, Tirosina, Glutamato, Succinato o Citrato como fuente de carbono, o en medio LB como fuente de carbono y nitrógeno. +++ indica $Abs_{600} > 0,8$ tras 7 horas; ++ significa $Abs_{600} > 0,8$ tras 10 horas; + indica $Abs_{600} > 0,8$ tras 15 horas; +/- denota $Abs_{600} > 0,8$ tras 21 horas y – indica no crecimiento o $Abs_{600} > 0,8$ tras 40 horas de incubación. C: carbono, N: nitrógeno.

Además, se complementó el mutante MPO401 transformando el plásmido pMPO1250 que contenía una copia de *cbrB* expresado bajo su propio promotor, y se analizó el crecimiento en un medio que contenía citrato como fuente de carbono. La estirpe MPO401/pMPO1250 creció con una tasa de crecimiento similar a la estirpe silvestre, a diferencia de la misma estirpe sin el plásmido que no era capaz de utilizar el citrato como fuente de carbono. La complementación del fenotipo de crecimiento demostró que CbrB es el responsable de la capacidad de utilizar el citrato como fuente de carbono.

4.5.3.3. Resistencia a estrés por metales pesados

Se analizó la resistencia a estrés por metales pesados en las estirpes silvestre y mutantes MPO406 y MPO401 mediante ensayo de dilución en gota de forma similar al apartado 3.2.1. Para ello

se sembraron diluciones seriadas en placas de LB que contenían zinc 4 mM o cobre 5 mM (Figura 49). Se observó que la estirpe silvestre era más sensible que las estirpes mutantes a los dos metales, y además que los dos mutantes presentaban una resistencia muy similar a la presencia estos metales (Figura 49).

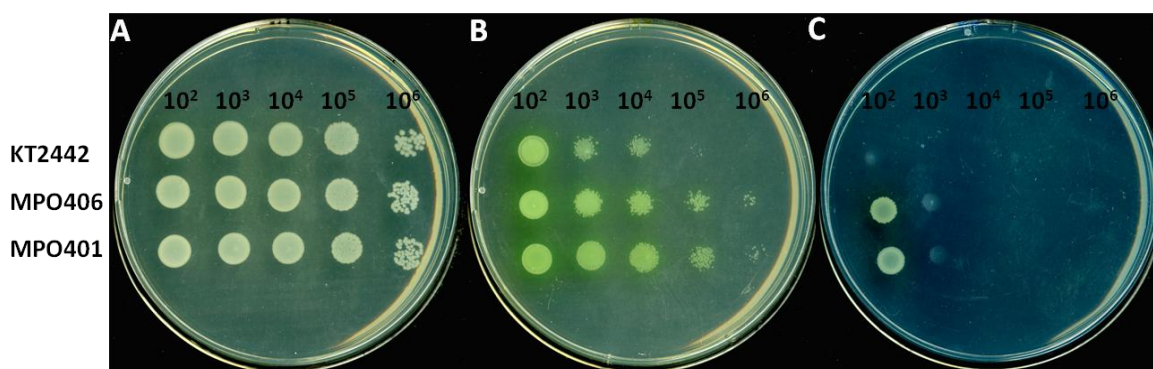


Figura 49. Resistencia a metales pesados en dilución en gota en *P. putida* y mutantes *cbrB*. Se sembraron diluciones seriadas de 10^2 a 10^6 en gota de las estirpes *P. putida* KT2442 silvestre, y mutantes MPO406 y MPO401 en placas de LB en ausencia de metal (A) y en presencia de Zinc 4 mM (B) o Cobre 5 mM (C). Se observó su efecto transcurridas 24 horas .

4.5.3.4. Crecimiento en condiciones de limitación de hierro

Se analizó la supervivencia de las estirpes silvestre y mutantes MPO406 y MPO401 en condiciones de limitación de hierro realizando curvas de crecimiento en un medio mínimo M9 con succinato como fuente de carbono y presencia o ausencia de hierro añadido (ver materiales y métodos apartado 3.1.5.3). Cuando el medio llevaba la concentración estándar de hierro, $34 \mu\text{M}$, las estirpes silvestre y mutante MPO406 crecieron a tasas similares sólo que con un desfase de dos horas en la fase de latencia entre ambas. Sin embargo, el mutante MPO401 experimentó una fase de latencia prolongada incluso en presencia de hierro, de modo que las diferencias de esta estirpe en presencia y ausencia de hierro no fueron tan acusadas como en la estirpe MPO406 (Figura 50A). Estos datos sugieren que CbrB podría participar en el reclutamiento de hierro para sustentar el crecimiento. Además, al analizar los sobrenadantes de las estirpes se observó que, en ausencia de hierro, los mutantes producían un pigmento fluorescente amarillo verdoso (probablemente pioverdina) en igual o incluso mayor cantidad que la estirpe silvestre (figura 50B). Aunque este ensayo es cualitativo, permitió descartar que la síntesis de este pigmento estuviera relacionado con el fenotipo observado.

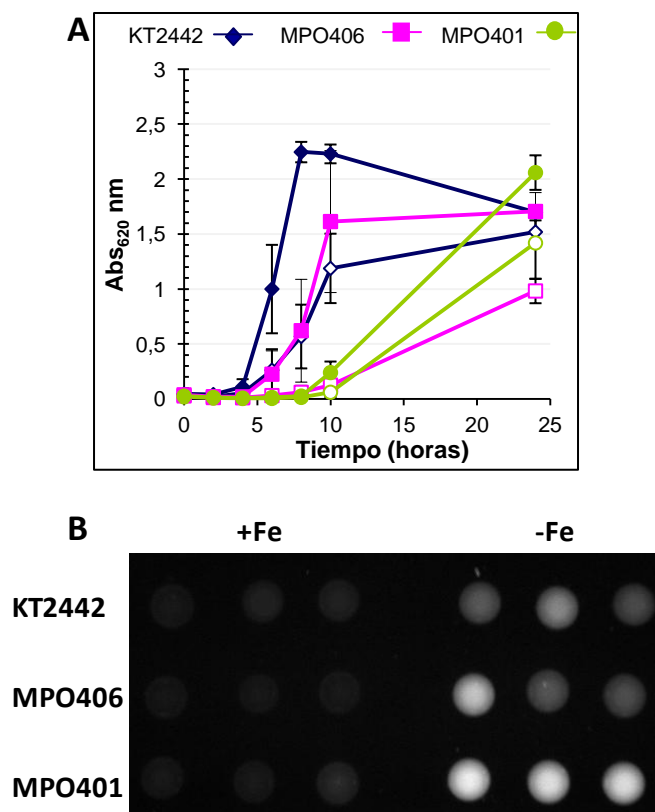


Figura 50. Crecimiento de *P. putida* silvestre y estirpes mutantes MPO406 y MPO401 en condiciones de limitación de hierro. A. Curva de crecimiento de *P. putida* KT2442, MPO406 y MPO401 medido como densidad óptica a 600 nm a lo largo del tiempo, en medio mínimo succinato+amonio en ausencia (-Fe) o presencia (+Fe) de hierro 34 μ M. Los simbolos vacíos representan la estirpe correspondiente en ausencia de hierro, y los llenos, en presencia del mismo. B. Fluorescencia bajo luz UV de gotas de 20 μ l de los sobrenadantes de las estirpes *P. putida* KT2442, MPO406 y MPO401 cultivados en ausencia (-Fe) o presencia de hierro (+Fe) tras 24 horas.

4.5.3.5. Movilidad/quimiotaxis

La movilidad del mutante MPO406 y MPO401 en placas de agar blando al 0,2 % con succinato 20 mM como fuente de carbono resultó ser de un 42% y un 49%, respecto a la de la estirpe silvestre (figura 51). La carencia de CbrB, por lo tanto, es responsable del defecto en la movilidad o quimiotaxis en *P. putida*.

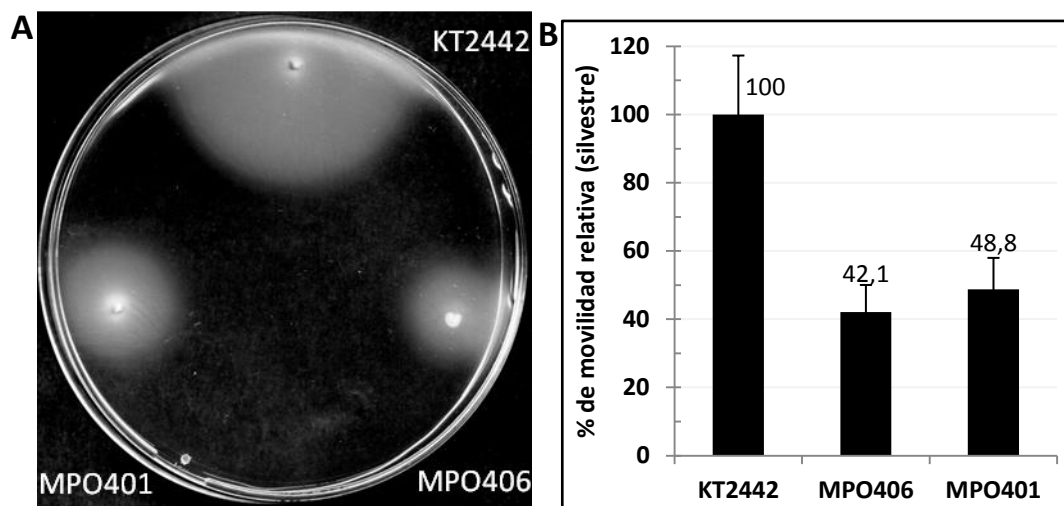


Figura 51. Movilidad en agar blando. A. Se muestra una imagen representativa de la movilidad de las estirpes *P. putida* KT2442 silvestre, MPO401 y MPO406 en agar blando 0,2 % con succinato+amonio. B. Se representa cuantitativamente la movilidad de las estirpes MPO406 y MPO401 relativa a la de la estirpe silvestre, medida como distancia entre el punto de inoculación y la migración obtenida. Los datos representan la media de 6 réplicas biológicas, con la correspondiente desviación estándar.

El análisis de los fenotipos anteriormente presentados a excepción de la capacidad de producir biofilm, permite concluir que CbrB participa en el control de los procesos que los provocan; es decir, movilidad, quimiostasis, tolerancia a metales, almacenaje de hierro o asimilación de distintos aminoácidos y citrato como fuente de carbono).

4.5.3.6. Análisis de la expresión de genes involucrados en el proceso de biofilms por RT-PCR cuantitativa en el fondo silvestre y mutantes *cbrB*

Dado que la eficiente formación de biofilm por parte de la estirpe MPO406 no está provocada por la carencia de CbrB, se procedió a caracterizar la expresión de genes que podrían tener un efecto en tal proceso en las estirpes MPO406 y MPO401, y detectar posibles diferencias entre las dos estirpes. Para ello, se recogieron cultivos en medio mínimo con L-aa 0,6 mM como fuente de carbono y nitrógeno tras 2 horas de incubación (fase exponencial media) y se procesaron las muestras como se ha descrito anteriormente (materiales y métodos). En la Figura 52 se muestran los resultados de la expresión de los genes *lapF* (codifica una adhesina), PP3932 (proteína con dominio GGDEF) y los genes PP3126 y PP3128 (síntesis de exopolisacáridos) en las estirpes silvestre y mutantes MPO406 y MPO401. Se emplearon las parejas de oligonucleótidos *lapF* 1Q/ *lapF* 2Q, PP3932 1Q/ PP3932 2Q, PP3126 1Q/ PP3126 2Q y PP3128 1Q/ PP3128 2Q, respectivamente. La expresión de *lapF* en el mutante MPO406 fue 1,7 veces superior a la detectada en la estirpe silvestre, mientras que los niveles detectados en el mutante MPO401 fueron similares. Por lo tanto la expresión de *lapF* no está sujeta a control por CbrB y los niveles más altos detectados en el mutante

MPO406 deben ser producidos por algún efecto producido por la inserción del minitransposón. La expresión de PP3932, que codifica una proteína de dominio GGDEF resultó 1,85 y 1,65 veces mayor en los mutantes MPO406 y MPO401, respectivamente, en comparación a la estirpe silvestre. Estos datos se corresponden con los obtenidos en los ensayos de *microarrays*, y se muestran reprimidos por CbrB, aunque los niveles de cambio no son muy grandes. El análisis de los transcritos de genes involucrados en la síntesis/transporte de exopolisacáridos (PP3126 y PP3128) resultaron ser 2,1 y 2,8 veces superiores en el mutante MPO406 respecto a los de la estirpe silvestre, y 2,9 y 3,9 veces más altos en el mutante MPO401, respectivamente. Estos datos confirmaban los datos obtenidos para estos genes por *microarrays*, indicando que el regulador CbrB estaría reprimiendo, directa o indirectamente, la expresión de ambos genes.

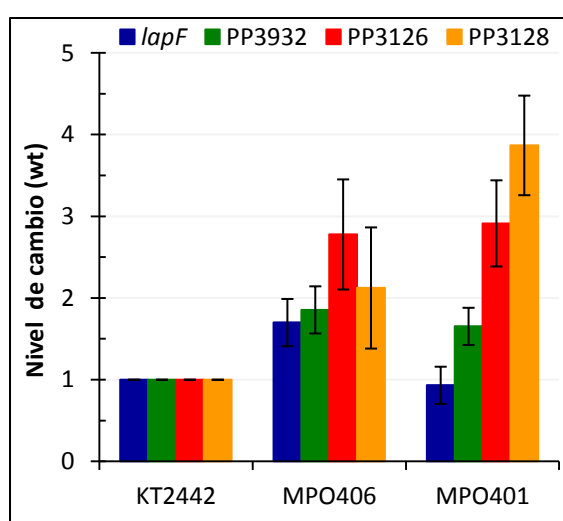


Figura 52. Cuantificación de la expresión de genes involucrados en el proceso de biofilms en *P. putida* KT2442, MPO406 y MPO401. Se cuantificó la expresión de *lapF*, PP3932, PP3126, PP3128 en *P. putida* KT2442 y mutantes MPO406 y MPO401 en medio mínimo L-aa 0,6 mM para comprobar si existía expresión diferencial dependiente de CbrB.

4.5.4. Caracterización molecular de los mutantes *cbrB* de inserción y delección.

Se realizó una caracterización molecular en detalle de los mutantes MPO401 y MPO406, para intentar discriminar los efectos que podría estar provocando la inserción del minitransposón en *cbrB* en el mutante MPO406, que no estuviesen relacionados con la ausencia de la proteína. El primer efecto detectado fue la presencia de un péptido truncado que contenía el extremo amino terminal de CbrB.

4.5.4.1. Reversión de la estirpe MPO406 a un genotipo silvestre

Con el fin de descartar que la estirpe MPO406 tuviera mutaciones adicionales en el cromosoma que le confieran algún fenotipo no relacionado con la carencia de *CbrB*, como alteraciones en adhesión o una elevada capacidad para formar biofilms, se procedió a revertir este mutante a un genotipo silvestre mediante recombinación homóloga con un fragmento de DNA con la secuencia silvestre. Para ello se subclonó un fragmento de 1,9 Kb digerido con *HindIII* del plásmido pMPO1243, que contenía la secuencia del gen *cbrB* silvestre bajo su propio promotor, en un el sitio *HindIII* del plásmido pEX18Tc. Este último es un plásmido suicida en *P. putida* que confiere sensibilidad a sacarosa, por contener el gen *sacB*. El plásmido resultante se denominó pMPO1245 y se transfirió por electroporación a la estirpe MPO406, y se seleccionaron colonias resistentes a tetraciclina, que habían integrado el plásmido. Luego se seleccionó la escisión del plásmido sembrando en cajas con sacarosa y se hicieron cruces en kanamicina para comprobar que hubieran perdido la resistencia a este antibiótico que iba ligada a la inserción. De las colonias que cumplían esos criterios, se analizó el fenotipo de seis candidatos y se comprobó que todos ellos habían perdido el fenotipo de agregación en cultivo líquido característica de la estirpe MPO406. Este fenotipo de agregación por lo tanto, se encontraba causado por la inserción del minitransposón en *cbrB*. Cuando se analizó la capacidad para formar biofilms de los candidatos, se comprobó que dos de ellos no formaban biofilms (datos no mostrados), y los 4 restantes también reproducían el fenotipo de la estirpe silvestre, aunque la formación del biofilm se producía de forma retrasada (Figura 53).

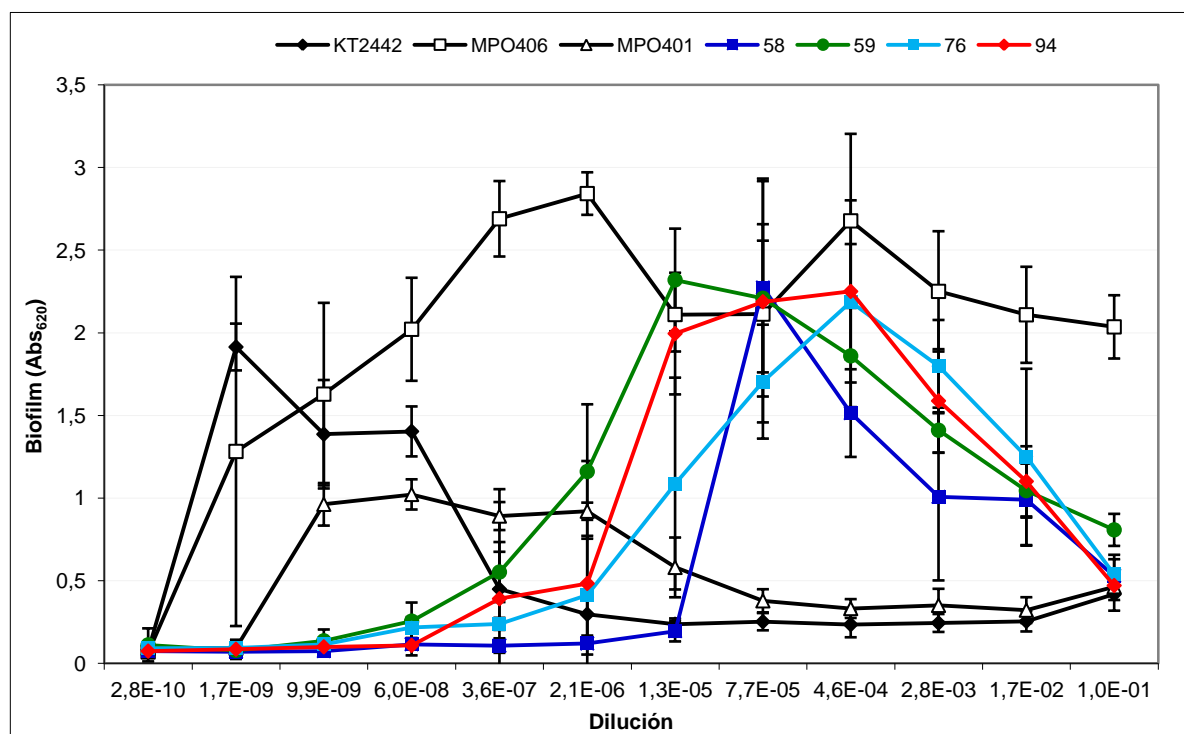


Figura 53. Curva de formación-dispersión de biofilms en candidatos revertientes. Se realizaron las diluciones que se indican en el eje X de cultivos creciendo toda la noche en medio LB para cada estirpe y se inocularon placas multipocillo, una por cada estirpe. Se incubaron las placas 24 horas y se tiñó la biomasa con cristal violeta 0,1 %, que se midió a Abs₆₂₀ nm. Se analizaron los candidatos revertientes 30, 58, 59, 76 y 94, usando como controles *P. putida* KT2442 silvestre, MPO406 y MPO401.

Se analizaron los candidatos 94, que tenía un fenotipo productor de biofilm igual a la estirpe silvestre, y el 58, que mostraba el mayor retraso en formar biofilm, mediante análisis de *Southern blot* usando sondas que contenían las correspondientes regiones flanqueantes al gen *cbrB* (sondas *cbrBR* y *cbrBL*, como en el apartado 4.2), pudiéndose comprobar que el patrón de restricción para ambos correspondía a la estructura genómica de la estirpe silvestre.

Los datos de estos experimentos de reversión muestran que la super-formación de biofilm por parte de la estirpe MPO406 es debida a la inserción del minitransposón en *cbrB*. El efecto retrasado en la formación/dispersión de biofilms observada en 4 de las 6 estirpes revertientes podría ser causada por algún efecto producido durante la recombinación, pero no parece probable que existan otras mutaciones involucradas.

4.5.4.2. Identificación de la existencia de un péptido de bajo peso molecular de la proteína CbrB en el mutante MPO406.

La detección de proteína total en un extracto de la estirpe silvestre y las dos estirpes mutantes, no permitieron apreciar diferencias significativas entre ellas. Por ello se realizó un análisis de *Western Blot* en cultivos creciendo en medio mínimo con succinato y amonio, utilizando un anticuerpo policlonal α -CbrB. En la estirpe silvestre no fue posible detectar CbrB (con una masa teórica estimada de 56 kDa), probablemente debido a que se encuentra en cantidad inferior al límite de detección (Figura 54, carril 1). En el mutante de delección MPO401, como es lógico, tampoco fue posible detectar la proteína CbrB (Figura 54, carril 3). Sin embargo, los anticuerpos α -CbrB detectaron en la estirpe MPO406 la presencia de un péptido de unos 37 kDa (Figura 54, carril 2), que debe corresponder a una forma truncada de la proteína CbrB a causa de la inserción del transposón en *cbrB*. En el carril 4 del gel se muestra la proteína CbrB con una cola de 6His purificada a homogeneidad que tiene un tamaño estimado de 56 kDa (datos sin publicar, Sofía Muñoz García-Mauriño). El tamaño estimado del péptido detectado era algo mayor que los 29 kDa teóricos calculados en el apartado 5.2., pero la presencia de un péptido derivado de CbrB era evidente. Este péptido también se detectó cuando el mutante creció en medio LB (no mostrado).

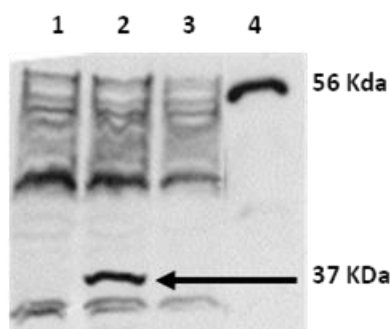


Figura 54. Identificación de un péptido de bajo peso molecular en MPO406 por western blotting. Ensayos de *Western blot* en medio mínimo con succinato+amonio con las estirpes *P. putida* KT2442 (carril 1), MPO406 (carril 2) y MPO401 (carril 3) con el anticuerpo policlonal AntiCbrB. La proteína CbrB-6His silvestre purificada se llevó como control de detección (carril 4). Con la flecha se marca el péptido de bajo peso molecular,

4.5.4.3. Cuantificación de la expresión de *cbrB* y los genes adyacentes en los mutantes MPO401 y MPO401 mediante RT-qPCR

Dado que la inserción del minitransposón se localizaba en *cbrB*, se estudió si podría estar ejerciendo algún efecto en la transcripción de genes adyacentes, y sobre su propia expresión, y se comparó con los niveles de expresión detectados en la estirpe silvestre y mutante MPO401 ($\Delta cbrB$). Los transcritos cuantificados fueron los correspondientes a *pcnB*, localizado aguas arriba, el propio *cbrB* y *crcZ*, que corresponde a un pequeño RNA no traducido y que se localiza aguas debajo de *cbrB*. En el caso de la cuantificación de los transcritos de *cbrB* se emplearon oligonucleótidos que amplificaban la región 5', que estaba presente en las tres estirpes, y una segunda pareja de oligos que hibridaban en la región 3' del transcrito, que en el mutante MPO406 está detrás de la inserción del minitransposón, y no está presente en el mutante MPO401 (ver Figura 55). Las condiciones experimentales del ensayo fueron las mismas que se habían empleado previamente para los experimentos de *microarrays*, es decir, cultivos en medio mínimo con L-aa a 12,6 mM (total) recogidos tras 2 horas de incubación.

La disposición cromosómica de los genes adyacentes a *cbrB* en las tres estirpes es la siguiente:

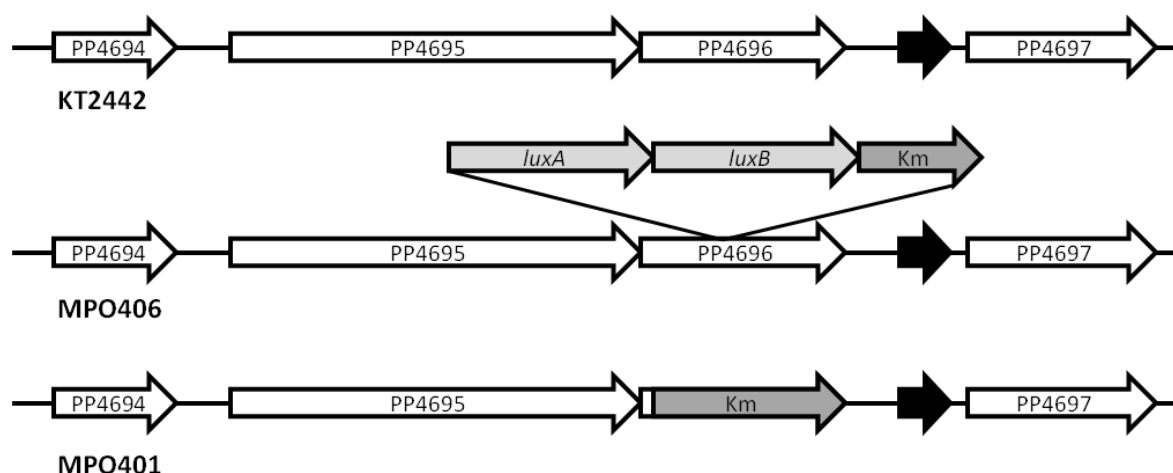


Figura 55. Representación esquemática de la organización genómica de la región cercana a *cbrB* para *P. putida* KT2442 silvestre y mutantes MPO406 y MPO401. Se muestran los genes adyacentes a *cbrB* (PP4696) en la estirpe silvestre (KT2442): PP4695 (*cbrA*), PP4697 (*pcnB*) y en negro el gen que codifica el pequeño RNA *crcZ*. En el mutante MPO406 se muestra el gen *cbrB* interrumpido por el transposón *miniTn5luxABKm*. En el mutante MPO401 ($\Delta cbrB$) se muestra el gen *cbrB* sustituido por *miniTn5-Km*.

Los análisis de la expresión se realizaron mediante RT-PCR cuantitativa, y se amplificaron los siguientes fragmentos, con los correspondientes pares de cebadores:

- Extremo 5' de *cbrB*: oligonucleótidos *cbrB23 1Q* / *cbrB74 2Q*
- Extremo 3' de *cbrB*: oligonucleótidos *cbrB 1Q* / *cbrB 2Q* (nucleótido 1076 de *cbrB*)
- pcnB*: oligonucleótidos *pcnB 1Q* / *pcnB 2Q*
- crcZ*: oligonucleótidos *crcZ49 1Q* / *crcZ99 2Q*

Las cuatro parejas de oligos se emplearon para cuantificar los transcritos en las tres estirpes, excepto la pareja b) del extremo 3' de *cbrB* que no se utilizó en la estirpe MPO401, puesto que carece de esa región.

En la Figura 56 se muestran los resultados de la expresión de los genes *cbrB* (con oligonucleótidos que hibridan en el extremo 5' y en el 3' del transcrito), *crcZ* y *pcnB*, en las estirpes silvestre y mutantes MPO406 y MPO401. La cuantificación de los transcritos de *cbrB* en la estirpe silvestre mostró que era constante cuando se amplificaba el extremo 5' o el 3'. Los niveles de transcrito en su extremo 5' en el mutante MPO401 era comparable a los de la estirpe silvestre. Sin embargo, los niveles de expresión de *cbrB* en el mutante MPO406 en el extremo 5' eran 2 veces superiores que en la estirpe silvestre, y en el extremo 3' alcanzaban niveles mucho más altos (24 veces) (Figura 56). Estos datos indicaban que en el mutante MPO406 debe existir un promotor interno, probablemente contenido dentro del mini transposón *miniTn5luxABKm*, que está dirigiendo la transcripción de los genes localizados aguas abajo. Estos datos de expresión de *cbrB* coinciden con

los obtenidos en los análisis de *microarrays*, donde se había detectado sobreexpresión del gen en el fondo MPO406. La expresión de *pcnB* no se vió alterada significativamente en ninguno de los tres fondos analizados, lo que indica que su expresión es independiente de CbrB en *P. putida*. Los niveles de expresión de *crcZ* fueron muy elevados en comparación con otros genes, por lo que en la Figura 54 se ha adaptado la escala. La expresión de *crcZ* en el mutante MPO401 se redujeron 10 veces respecto a los niveles detectados en la estirpe silvestre, ya que está activada por CbrB, como se había descrito (Sonnleitner y col., 2009; Moreno y col., 2012). Sin embargo, la expresión de *crcZ* en el mutante de inserción MPO406 alcanzó niveles tan altos como los de la estirpe silvestre. Esto indica de nuevo que existe una transcripción desde un promotor probablemente localizado en el interior del minitrasnposón, y que dirige la expresión de los genes localizados aguas abajo, a pesar de la presencia teórica de los correspondientes terminadores de la transcripción.

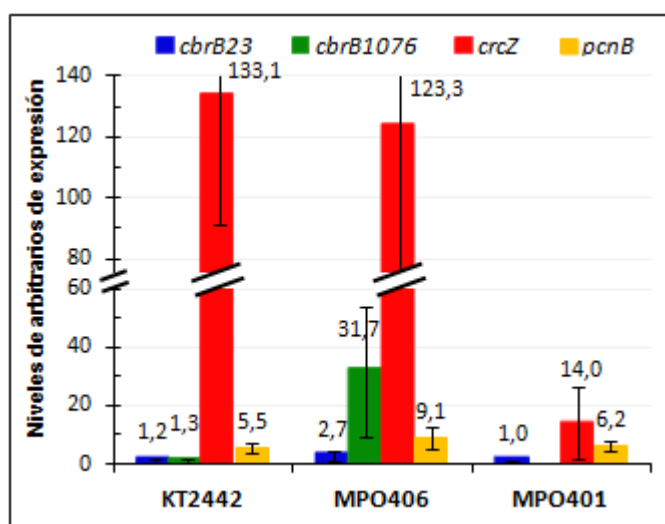


Figura 56. Cuantificación de la expresión de *cbrB*, *crcZ* y *pcnB* por RT-PCR cuantitativa en *P. putida* KT2442, MPO406 y MPO401. Se cuantificó la expresión de *cbrB* antes (rojo, *cbrB* 5') y tras la inserción (verde, *cbrB* 3'), *crcZ* (rojo) y *pcnB* (amarillo) en *P. putida* KT2442 y mutantes MPO406 y MPO401 en medio mínimo L-aa 0,6 mM.

Para confirmar si existía expresión de *crcZ* desde un promotor aguas arriba, diferente al suyo propio, se llevó a cabo un mapeo del inicio de transcripción de *crcZ* mediante *primer extension* en las 3 estirpes, utilizando el oligonucleótido PExcrz. El inicio de la transcripción para la estirpe silvestre y mutante MPO401 se localizó en una T a 12 nucleótidos de un posible promotor σ^N (Figura 57, carriles 1 y 3). La expresión de *crcZ* en el mutante MPO401 fue inferior a la detectada para la estirpe silvestre, como mostró la cuantificación mediante RT-PCR. Sin embargo, el mutante MPO406 presentaba un transcrito muy débil en esa posición, y además mostró una transcripción residual aguas arriba, que se extendía hasta el inicio del carril (carril 2). Además, se observó que en esta estirpe existían dos posiciones con alta intensidad, que correspondían a los nucleótidos T y G

localizados a 5 y 6 pb, respectivamente, del inicio silvestre. Estos datos confirmaban que existía expresión *read-through* de *crcZ* independiente de la del promotor σ^N .

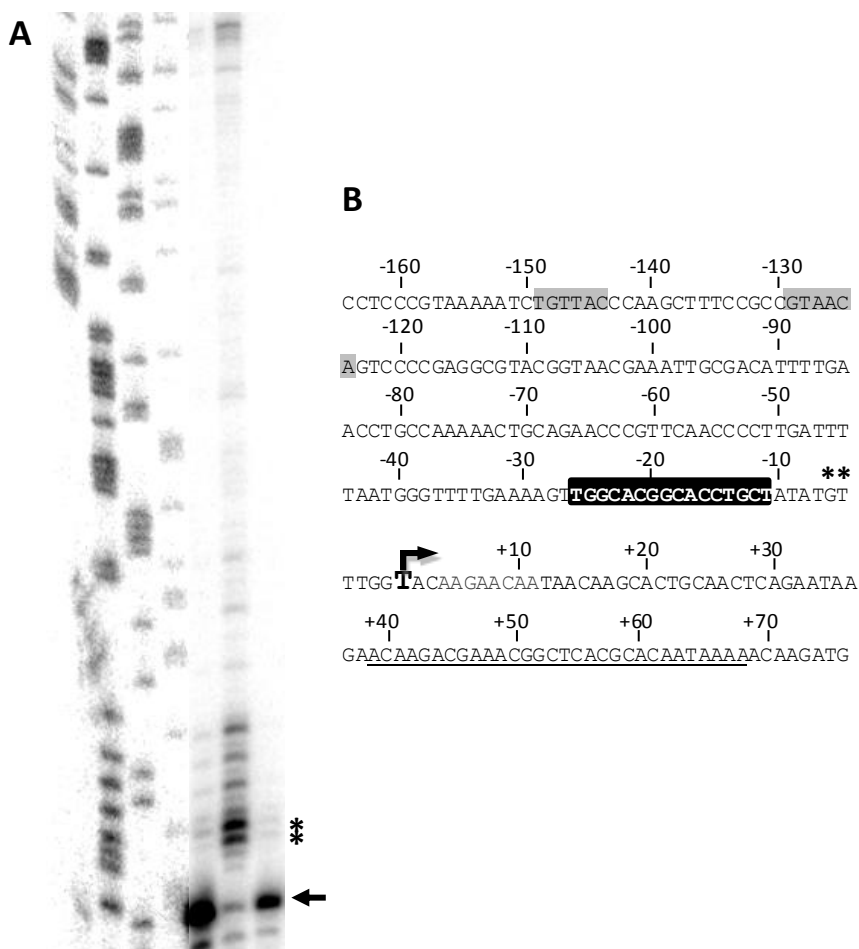


Figura 57. Determinación del extremo 5' de *crcZ* mediante análisis de *Primer extension*. A. Reacciones de *primer extension* con RNA obtenido de las estirpes *P. putida* KT2442 (carril 1), mutante MPO406 (carril 2) y mutante MPO401 (carril 3) cultivadas en un medio definido con L-aminoácidos 0,6 mM. Los 4 primeros carriles indican las reacciones de secuenciación con los nucleótidos G, A, T o C. B. Secuencia promotora de *crcZ*. La secuencia del oligonucleótido empleado para el análisis aparece subrayada. El nucleótido de inicio se marca en mayor tamaño y con una flecha, mientras que se marcan con asterisco las posiciones más intensas en el mutante MPO406. La secuencia del promotor σ^N aparece en la caja negra, y los posibles subsitos de unión de CbrB en las cajas grises.

Además de caracterizar la expresión de *cbrB* en un medio mínimo que contenía L-aa, se determinó la expresión en diferentes medios, para los mutantes MO401 y MPO406. Datos previos indicaron que la expresión en la estirpe silvestre era constitutiva en los medios analizados (LB, succinato, citrato y L-aa) (Figura 22). La cuantificación de *cbrB* se realizó empleando los oligonucleótidos *cbrB23_1Q* / *cbrB74_2Q* mediante RT-qPCR.

La expresión de *cbrB* en el mutante MPO401 resultó ser constante independientemente del medio de cultivo, pero no sólo no se vió incrementada por la mutación *cbrB* sino que resultó ser alrededor de la mitad que la detectada en la estirpe silvestre (Figura 58). Los niveles de expresión de *cbrB* en el mutante MPO406 fueron distintos en función de la fuente de carbono utilizada, siendo máxima en un medio con succinato, que son condiciones libres de represión catabólica, y mínima en un medio LB (condiciones de RC). Se demuestra de nuevo una alteración en la expresión de *cbrB* en el mutante MPO406, consecuencia de la inserción.

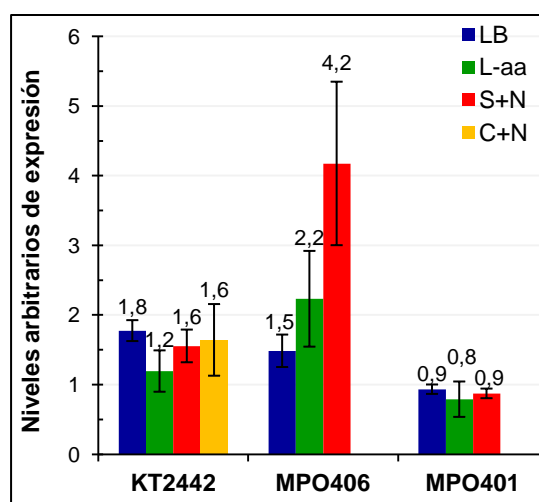


Figura 58. Medida de la expresión de *cbrB* por RT-qPCR en *P. putida* KT2442. Se analizó la expresión de *cbrB* mediante RT-qPCR de células de *P. putida* KT2442 creciendo en fase exponencial media ($A_{600} = 0,3$) en LB, L-aminoácidos (L-aa), succinato+amonio (S+N) y citrato+amonio (C+N).

4.5.4.4. Caracterización de los elementos identificados en el mutante MPO406, que provocan una superproducción y falta de dispersión de biofilms

Hasta el momento hemos identificado dos elementos en el mutante MPO406 que provocan una muy eficiente formación de biofilm, y que éste no disperse aunque se agoten los nutrientes del medio. Estos dos elementos son: la presencia de un péptido truncado que contiene el extremo amino terminal de CbrB, y unos niveles muy altos del sRNA CrcZ. Por lo tanto se decidió estudiar si cada elemento por separado, o los dos de forma conjunta, podían provocar este fenotipo en la formación de biofilms en *P. putida*.

4.5.4.4.1. Complementación *en trans* del mutante MPO401 con versiones truncadas de la proteína CbrB en multicopia

Para comprobar si el péptido truncado detectado en la estirpe MPO406 era el responsable de los fenotipos de superproducción y falta de dispersión del biofilm descritos para el mutante MPO406, se construyeron distintas versiones truncadas del extremo amino terminal de CbrB.

En primer lugar se construyó un plásmido que contenía *cbrB* expresado bajo su propio promotor con la secuencia codificante de los primeros 151 aminoácidos (incluyendo el dominio REC, receptor de la fosforilación). La segunda construcción contenía la secuencia codificante de CbrB hasta el aminoácido 223 (punto donde se localizó la inserción del minitransposón) y una última que contuviera exactamente la misma secuencia de *cbrB* que se había secuenciado en el mutante MPO406, incluyendo aquellos nucleótidos que codificaban aminoácidos del transposón (Figura 59). El oligonucleótido sentido utilizado fue el mismo para las tres versiones (PcbrB_HindIII_fwd), mientras que los antisentido variaron en función de la versión; *cbrB_deltaCD_HindIII_rev* (R1), *cbrBtruncado_HindII_rev* (R2) y *cbrBtruncado_luxA_rev*(R3), respectivamente. Se amplificaron los correspondientes fragmentos mediante PCR utilizando las distintas parejas de oligonucleótidos y usando DNA cromosómico de *P. putida* KT2442 como molde. Los productos amplificados de las versiones 1 y 2 contenían la diana *HindIII* en ambos extremos, y fueron posteriormente clonados en la diana *HindIII* del plásmido pBBRMCS-4, que es replicativo en *P. putida*. El producto de PCR de la versión 3 se clonó en la diana *HindIII* (romo) de pBBRMCS-4. Se seleccionaron colonias blancas resistentes a ampicilina y se analizaron por restricción aquellos candidatos que tuvieran el inserto en sentido contrario al péptido α -LacZ. Los candidatos que cumplían el patrón de restricción se comprobaron por secuenciación, denominando a los plásmidos resultantes con las versiones 1, 2 y 3, pMPO1240, pMPO1241 y pMPO1242, respectivamente.

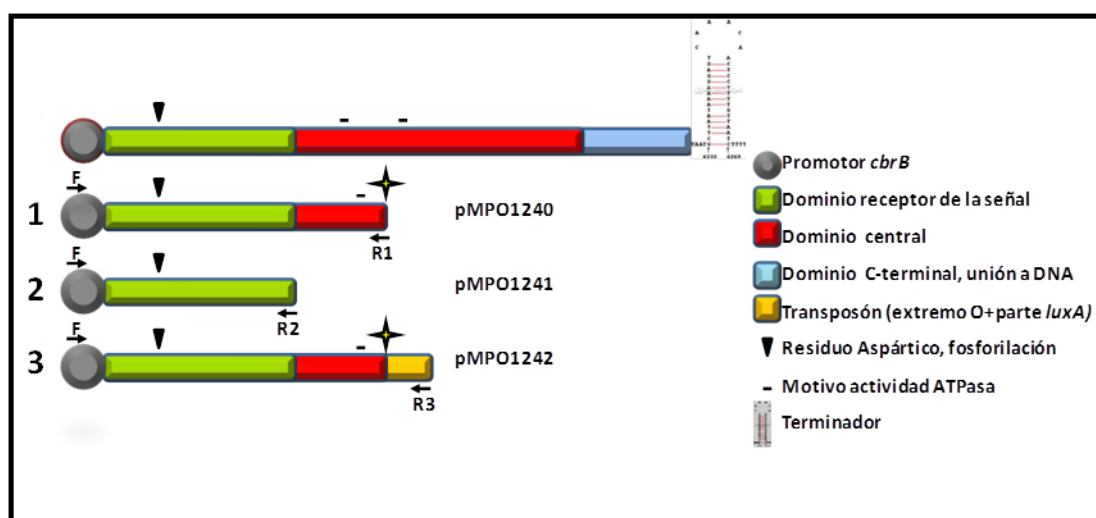


Figura 59. Diseño de versiones truncadas de CbrB para complementación *en trans*. Se muestran los dominios de CbrB en la proteína silvestre (arriba): amino-terminal (receptor de la señal, que contiene el residuo Aspártico), central (interacción σ N con motivos ATPasa) y carboxilo-terminal (unión DNA). También se muestran las construcciones truncadas de CbrB: truncado670 (1), Δ CD (2) truncado lux (3), en pMPO1240, pMPO1241 y pMPO1242, respectivamente.

Los plásmidos pMPO1240, pMPO1241 y pMPO1242, que contenían las secuencias codificantes correspondientes a las tres versiones truncadas de CbrB, se transfirieron a la estirpe silvestre y mutante MPO401 y se analizó la formación de biofilms. Como control, se utilizó la estirpe MPO406 con los distintos plásmidos. Se realizaron cinéticas de formación de biofilms transcurridas a lo largo del tiempo (0, 4, 8 y 24 horas de incubación) (Figura 60). La estirpe silvestre que contenía los plásmidos pMPO1240 y pMPO1241 resultó ser resistente a la dispersión (24 horas), aunque no sufría cambios en formación en comparación con el control (pBBRMCS-4). Sin embargo, la presencia del plásmido pMPO1242 no produjo ningún efecto en formación o dispersión del biofilm (Figura 60A).

Cuando se analizó la capacidad de formación y dispersión del biofilm en MPO401 con los plásmidos pMPO1241 y pMPO242, no se observó un efecto sustancial. Solamente la presencia del plásmido pMPO1240, provocó una ligera resistencia a la dispersión del biofilm en comparación con el control (pBBRMCS-4). En ningún caso se hubo superproducción del biofilm con la estirpe MPO401 (Figura 60B).

De forma similar, el suministro *en trans* de las tres versiones truncadas de CbrB no produjo ningún efecto en formación o dispersión en MPO406, empleado como estirpe control en este ensayo (Figura 60C).

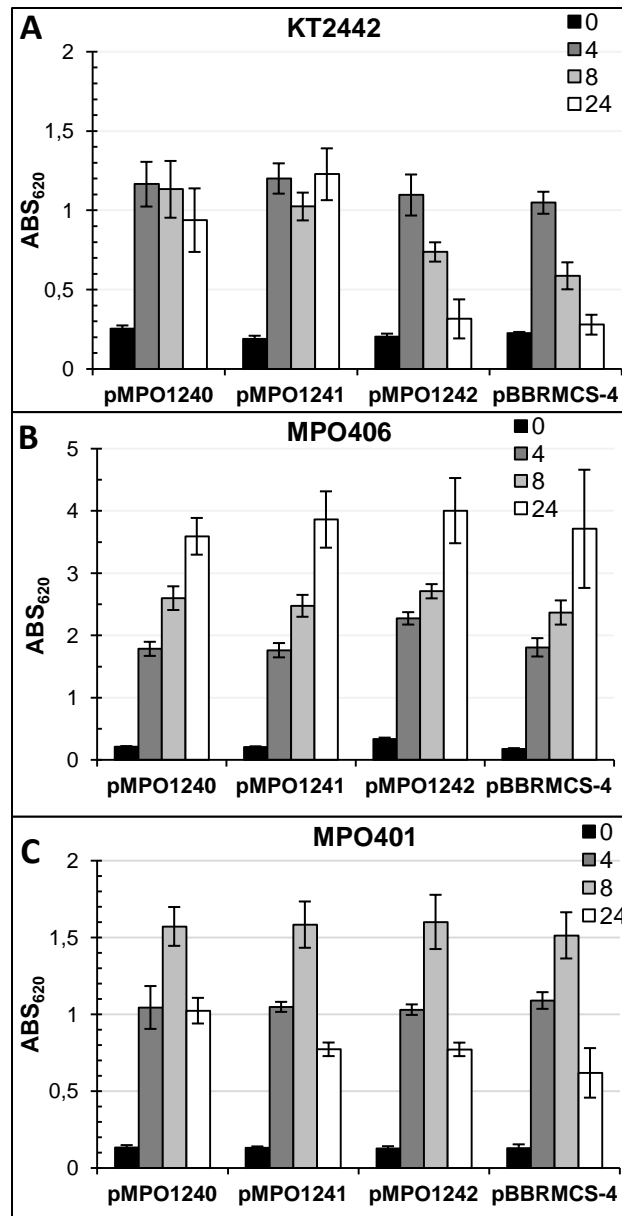


Figura 60. Análisis de la formación de biofilms por las estirpes silvestre y mutantes MPO401 y MPO406 complementados con las versiones truncadas de CbrB. Se cuantificó la adhesión en microplaca de las estirpes *P. putida* KT2442 (A), MPO406 (B) y MPO401 (C) al cabo de 0, 4, 8 y 24 horas cuando portaban los plásmidos con las versiones truncadas de CbrB pMPO1240, pMPO1241, pMPO1242. Como control se usó el plásmido vacío, pBBRMCS-4.

La presencia de un péptido truncado de CbrB que contiene el extremo amino-terminal parece tener un efecto en la dispersión de un biofilm formado por *P. putida*, aunque no en la superproducción del mismo, al menos en la dosis ensayada. Hay que destacar que este péptido truncado sólo contiene el dominio receptor de la respuesta característico de este tipo de reguladores, encargado de la recibir de la señal de fosforilación por parte del elemento sensor. Este péptido no contiene ni el dominio central de interacción con el factor σ ni el dominio carboxi-terminal de unión a DNA, y por lo tanto, si produce algún efecto lo hace por interacción mediante el primer dominio.

4.5.4.4.2. Superproducción del RNA pequeño *crcZ* bajo un promotor heterólogo en KT2442 y MPO401

Además de la presencia de un péptido truncado en el mutante de inserción MPO406, se había detectado una elevada transcripción del RNA pequeño *CrcZ* probablemente iniciada desde el transposón. Para estudiar si estos niveles elevados pudieran tener un efecto en la formación/dispersión de biofilms, se superprodujo *crcZ* para estudiar su efecto. Para ello se clonó *crcZ* bajo el promotor heterólogo *P_{tac}* en el vector de expresión pJB3Km-1. Además se diseñaron tres versiones distintas en las que el gen se encontraba con un espaciamiento de 5, 6 o 7 nucleótidos entre la secuencia promotora y el inicio de *crcZ*. Se usaron oligonucleótidos para amplificar un fragmento con una diana *Bam*HI en el extremo 5', la secuencia íntegra de *P_{tac}*, un espaciador de 5 (Ptac-crcZ1_BamHI_F), 6 (Ptac-crcZ2_BamHI_F), o 7 (Ptac-crcZ3_BamHI_F) nucleótidos, y a continuación el principio de *crcZ*. Como oligonucleótido antisentido se usó el mismo para los tres casos (Ptac-crcZ_EcoRI_R), que introducía una diana *Eco*RI en el extremo 3' del producto. Los tres productos se amplificaron por PCR con los correspondientes oligonucleótidos y se clonaron de forma dirigida en las dianas *Eco*RI y *Bam*HI del plásmido pJB3Km-1. Este plásmido es replicativo en *P. putida*, y contiene las resistencias a carbenicilina y a kanamicina. Además es compatible con el plásmido pBBRMCS-4, en el que se encuentran clonadas las versiones truncadas de *CbrB*. Se seleccionaron colonias resistentes a kanamicina y se analizaron candidatos por PCR con oligos Ptac-crcZ1_BamHI_F y Ptac-crcZ_EcoRI_rev. Los candidatos positivos se analizaron por restricción y secuenciación y se obtuvieron los plásmidos pMPO1247, pMPO1248 y pMPO1249. En la Figura 61 se representa un esquema de las construcciones.

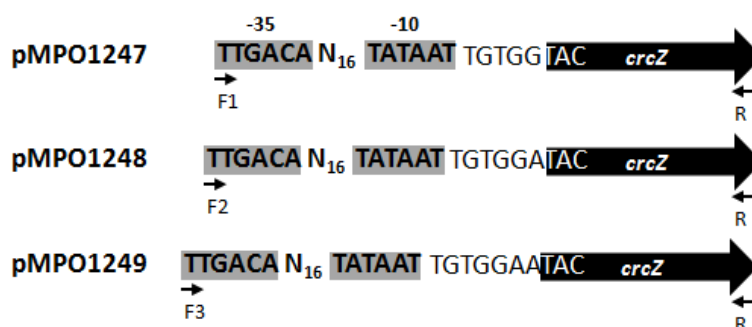


Figura 61. Representación de los insertos para sobexpresar *CrcZ* de forma heteróloga en el vector de expresión pJB3Km-1.

Los plásmidos pMPO1247, pMPO1248 y pMPO1249 se transfirieron a la estirpe silvestre de *P. putida* y al mutante MPO401. Para comprobar que *CrcZ* se estaba efectivamente expresando en las condiciones analizadas, en primer lugar se procedió a cuantificarlo en los dos fondos genéticos

mediante RT-PCR cuantitativa, a partir de RNA extraído de cultivos en medio LB en fase exponencial media. Como se muestra en la figura 62, la expresión de *crcZ* en la estirpe silvestre era siempre alta y constitutiva, debido a los niveles endógenos de la propia estirpe desde el cromosoma. Sin embargo, los niveles de la estirpe MPO401, que eran muy bajos cuando el plásmido estaba vacío, aumentaban unas 289 veces su expresión al introducir el plásmido pMPO1249, que expresaba *crcZ* bajo el promotor *Ptac* con un espaciador de 7 nucleótidos. Las otras dos construcciones no consiguieron producir los mismos niveles de *crcZ*. Los datos indican que la estirpe silvestre no puede aumentar los niveles de *crcZ* que produce endógenamente, aunque se le suministren más copias del transcrito. Sin embargo los niveles de *crcZ* en el mutante de delección fueron superiores a los de la estirpe silvestre.

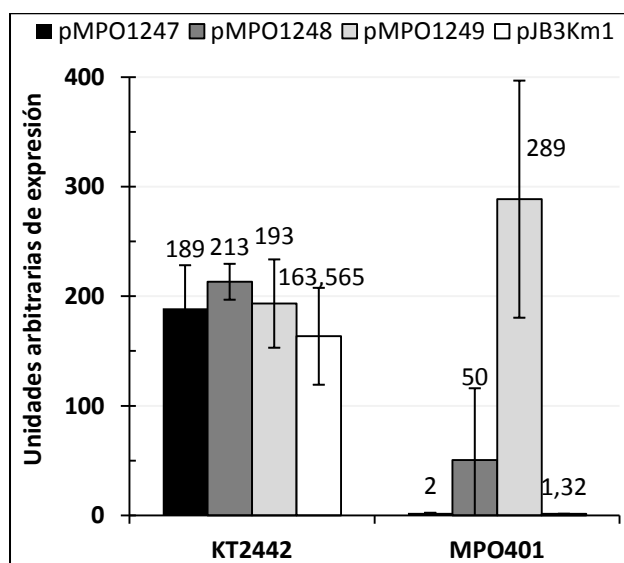


Figura 62. Cuantificación de la expresión de *crcZ* por RT-PCR cuantitativa. Se cuantificó la expresión de *CrcZ* mediante RT-PCR cuantitativa en *P. putida* KT2442 y MPO401 portando los plásmidos pMPO1247, pMPO1248, pMPO1249 diseñados y el plásmido vacío pJB3Km1 como medida control.

Una vez comprobado que *crcZ* se expresaba a niveles elevados, se procedió a estudiar su efecto sobre la formación de biofilms. Para ello se analizó la capacidad de formación y dispersión de biofilm en microplacas, en los fondos silvestre y MPO401, cuando portaban los plásmidos de superproducción. El análisis de la formación de biofilm indicó que la presencia de altos niveles de *crcZ* no provocaba ningún efecto detectable sobre la formación o dispersión de biofilms en *P. putida*. Por esta razón, se procedió a combinar los dos elementos de forma conjunta; altos niveles de *CrcZ* y la presencia de la forma truncada N-terminal de *CbrB*. Sin embargo, diversos problemas de carácter técnico impidieron proporcionar ambos elementos de forma simultánea. Por ello, no puede descartarse que la conjunción de ambos elementos pueda mimetizar los fenotipos de superproducción y resistencia a dispersión de biofilm de la estirpe MPO406.

A modo de resumen, en el presente capítulo se llevó a cabo un análisis comparativo entre los mutantes MPO401 y MPO406, que demostró la implicación de CbrB en los distintos procesos analizados, salvo en la producción y dispersión de biofilms, que parece ser fruto de un mecanismo regulador no relacionado con CbrB silvestre. Además, se han identificado los posibles elementos responsables de tal mecanismo alternativo, consistente en la producción de un péptido de bajo peso molecular de CbrB (extremo N-terminal) así como elevados niveles del RNA pequeño CrcZ, que está implicado en el proceso de represión catabólica en *P. putida*.

4.6. Capítulo 6: Análisis de la regulación por CbrB de los RNAs pequeños CrcZ y CrcY

En 2009 se describió la implicación del sistema Cbr en la regulación de la expresión del RNAs pequeño CrcZ involucrado en represión catabólica en *P. aeruginosa* (Sonnleitner y col., 2009; Abdou y col., 2011) y posteriormente en *P. putida* (Moreno y col., 2012). Además se identificó un segundo sRNA denominado CrcY cuyo papel en RC era igual que el descrito para CrcZ (Moreno y col., 2012). Moreno y colaboradores describieron que la regulación ejercida por CbrB sobre la expresión de los RNAs pequeños CrcZ y CrcY, dependientes del factor alternativo σ^N . En el laboratorio ya habíamos comenzado a caracterizar el papel que ejerce el sistema Cbr en la regulación de estos RNAs pequeños en *P. putida*, de modo que intentamos abarcar aspectos de la regulación no descritos.

4.6.1. Análisis de la expresión de los pequeños RNA CrcZ y CrcY en la estirpe silvestre y mutantes MPO406 y MPO401

La inspección de las regiones promotoras de *crcZ* y *crcY* permitió identificar las secuencias consenso de unión de σ^N , así como posibles secuencias consenso de unión de CbrB similares a las descritas por Abdou y col. (Abdou y col., 2011). Para investigar el efecto ejercido por CbrB sobre la expresión de *crcZ* y *crcY*, en condiciones de RC (LB) y no represión catabólica (succinato), se analizó el patrón de expresión mediante RT-qPCR en las estirpes silvestre y mutantes MPO406 y MPO401. Para ello, recogieron cultivos en fase exponencial media creciendo en un medio LB y en un medio mínimo con succinato como fuente de carbono, y se retrotranscribió el RNA procedente de los cultivos como se detalla en materiales y métodos. Para cuantificar la transcripción de *crcZ* y *crcY* se emplearon las parejas de oligonucleótidos *crcZ*49_1Q/*crcZ*99_2Q, y *crcY*439_3Q/*crcY*490_4Q respectivamente.

La expresión de *crcZ* en la estirpe silvestre resultó ser alrededor de 3 veces más abundante en un medio mínimo con succinato (condiciones no represoras) que en un medio LB (condiciones de

represión catabólica). En el mutante de delección MPO401 ($\Delta cbrB$) los niveles de *crcZ* se vieron sustancialmente reducidos respecto a la estirpe silvestre (Figura 63), mostrando sólo un 7,7 % de la expresión de una estirpe silvestre en LB y 5 % en succinato, lo cual concuerda con la activación de la expresión de *crcZ* por parte de CbrB descrita en *P. aeruginosa* y *P. putida* (Sonnleitner y col., 2009; Moreno y col., 2012) (García-Mauriño, enviado). Como ya habíamos apuntado previamente (Figura 58), los niveles de *crcZ* en el mutante MPO406, eran anormalmente altos como consecuencia de la inserción del minitransposón.

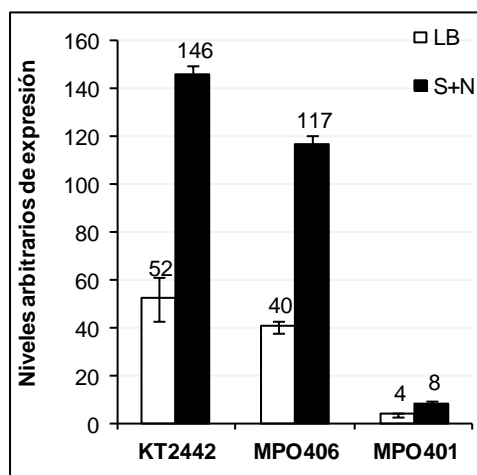


Figura 63. Medida de la expresión de *crcZ* mediante RT-PCR cuantitativa. Se cuantificó la expresión de *crcZ* mediante RT-PCR cuantitativa en cultivos de *P. putida* KT2442 y los mutantes MPO406 y MPO401 cuando se encontraban en fase exponencial en un medio LB o en un medio mínimo con succinato como fuente de carbono.

El patrón de expresión del otro RNA pequeño descrito en *P. putida*, *crcY*, resultó ser similar al detectado para *crcZ* en la estirpe silvestre, aunque los niveles absolutos de transcrito fueron inferiores. Así, la expresión en un medio LB para la estirpe silvestre fue de un 22% respecto a un medio definido con succinato como fuente de carbono (Figura 64). Cuando se analizó la expresión de *crcY* en la estirpe mutante MPO401, también se observó una reducción considerable en la transcripción (29% de expresión en LB y 28 % en succinato). Sin embargo, en este caso, los niveles de *crcY* no disminuyeron tanto como los de *crcZ*, manteniendo una expresión basal no dependiente de CbrB (Figura 64). La expresión de *crcY* en el fondo MPO406 resultó ser comparable a la detectada en el mutante de delección $\Delta cbrB$ MPO401 (29 y 25 % en LB y succinato), lo que indica que la expresión de este RNA pequeño no se encuentra alterada por la inserción del minitransposón en *cbrB*.

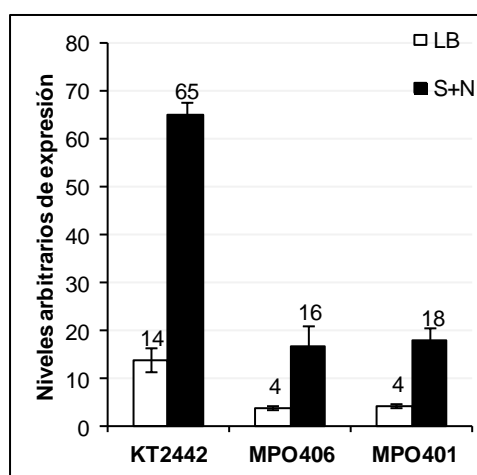


Figura 64. Cuantificación de la expresión de *crcY* mediante RT-PCR cuantitativa. Se cuantificó la expresión de *crcY* mediante RT-PCR cuantitativa en cultivos de *P. putida* KT2442 y los mutantes MPO406 y MPO401 cuando se encontraban en fase exponencial en un medio LB, medio mínimo con succinato como fuente de carbono.

4.6.2. Mapeo del sitio de inicio de la transcripción de los pequeños RNA CrcY y CrcZ en las estirpes silvestre y MPO401 ($\Delta cbrB$)

Con el fin de determinar el inicio de la transcripción para *crcZ* y *crcY* en las estirpes silvestre y mutante MPO401 ($\Delta cbrB$) se realizaron ensayos de *primer extension* en un medio LB (medio de represión catabólica) y en un medio mínimo que contenía succinato como fuente de carbono (medio no represor). Para ello, se emplearon los oligonucleótidos PExcrz y PexcrcY, respectivamente. Se determinó el extremo 5' de los transcritos de *crcZ* y *crcY* a partir de RNA total obtenido en las condiciones del apartado 5.1.

El inicio de la transcripción de *crcZ* en la estirpe silvestre, que se había localizado previamente (figura 55), confirmó estar localizado en una T a 12 nucleótidos de una secuencia que cumplía el consenso para promotores de tipo σ^N (recuadro negro). Además se localizaron dos hexámeros que coincidían con el consenso descrito para la unión de CbrB (Abdou, 2011) a 148 y 139 nucleótidos aguas arriba del inicio de *crcZ*. Cuando se analizó la expresión de *crcZ* en el fondo MPO401 ($\Delta cbrB$), se comprobó que la cantidad de transcrito era prácticamente indetectable, mostrando su dependencia de CbrB, e iniciaba en el mismo nucleótido (Figura 65, carriles 3 y 4).

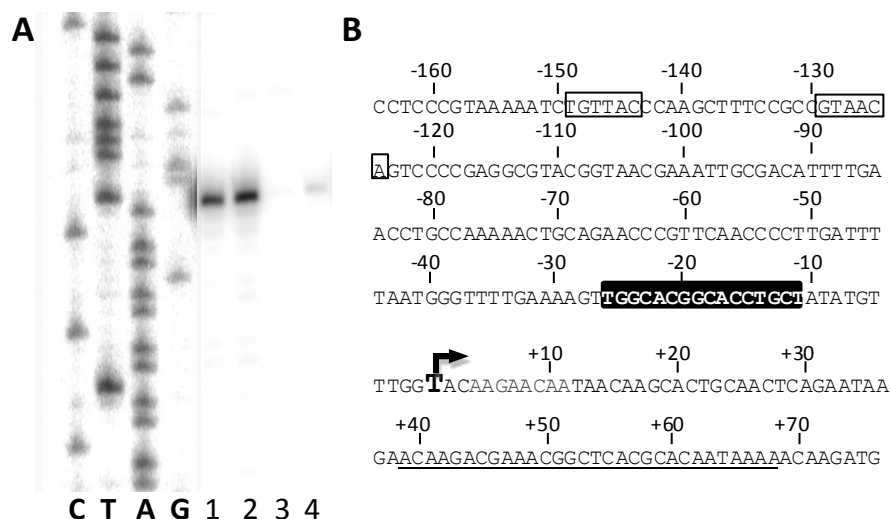


Figura 65. Determinación del sitio de inicio de la transcripción de *crcZ* mediante análisis de *Primer extensión* en la estirpe silvestre y mutante MPO401. A. Reacciones de *primer extensión*. Se localizó el inicio de *CrcZ* utilizando 10 µg de RNA aislado de un cultivo en fase exponencial (OD=0,3) en un medio LB y medio mínimo con succinato como fuente de carbono para *P. putida* KT2442 (carriles 1 y 2) y el mutante MPO401 (carriles 3 y 4). B. Secuencia promotora de *crcZ*. La secuencia del oligonucleótido empleado para el análisis aparece subrayada. El nucleótido de inicio se marca en mayor tamaño y con una flecha, la secuencia del promotor σ^N aparece en la caja negra, y los posibles subsitios de unión de CbrB con recuadro claro. En gris se muestran los sitios que reconoce Crc para la unión a CrcY.

El inicio de la transcripción de *crcY* en la estirpe silvestre se localizó en una A a 13 nucleótidos de una secuencia que cumple el consenso para promotores tipo σ^N (recuadro negro) (Figura 66, carriles 1 y 2). A 149 y 115 nucleótidos aguas arriba del inicio de *crcY* se localizaron dos secuencias palindrómicas que coincidían con el consenso descrito para CbrB (Abdou y col., 2011). Como ya mostraron los datos de RT-qPCR para medir la expresión de *crcY* anteriormente, la técnica de *primer extensión* permitió detectar niveles de transcripción más altos en succinato en la estirpe silvestre en relación a un medio represor como el LB. La cantidad de transcrito detectado en el mutante MPO401 fue muy baja (carriles 3 y 4), lo que de nuevo apunta a una activación de la transcripción de *crcY* por parte de CbrB. A su vez, en el mutante de delección crecido en medio mínimo con succinato se aprecian bandas de mayor tamaño molecular, que sugieren que *crcY* se está expresando parcialmente desde un promotor localizado más arriba del promotor activado por CbrB. Esto concuerda con el elevado nivel basal de expresión de *crcY* observado en este mutante (Figura 66).

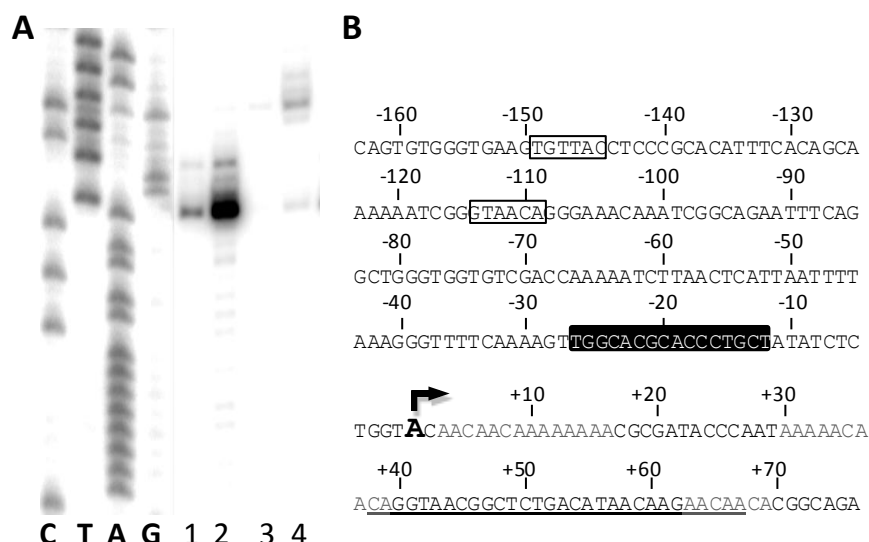


Figura 66. Determinación del sitio de inicio de la transcripción de CrcY por primer extension. Se localizó el inicio de CrcY utilizando 10 µg de RNA aislado de un cultivo en fase exponencial (OD=0,3) en un medio LB y medio mínimo con succinato como fuente de carbono para *P. putida* KT2442 (carriles 1 y 2) y el mutante MPO401 (carriles 3 y 4). La secuencia del oligonucleótido empleado para el análisis aparece subrayada. El nucleótido de inicio se marca en mayor tamaño y con una flecha, la secuencia del promotor σ^N aparece en una caja negra, y los posibles subsitios de unión de CbrB con recuadro claro. En gris se muestran los sitios que reconoce Crc para la unión a CrcY.

Estos datos complementan aquellos de RT-qPCR y permiten concluir que CbrB es el activador de los promotores de tipo σ^N de *crcZ* y *crcY*. Sin embargo, la presencia de un transcrito para *crcY* que proviene desde un promotor aguas arriba del promotor tipo σ^N indican que su expresión puede estar sujeta a otro tipo de regulación además de la ejercida por CbrB.

4.6.3. Construcción de un mutante nulo de *crcZ* y caracterización de sus fenotipos.

En el apartado anterior comprobamos que la expresión de los RNAs CrcZ y CrcY está activada por CbrB. Por lo tanto un mutante *cbrB* no es capaz de activar la expresión de los RNAs pequeños y aquellos fenotipos causados por la falta de expresión de *crcZ* o *crcY* sería común también a un mutante *cbrB*. Para comprobar esto, procedimos en primer lugar a la construcción de un mutante carente de *crcZ* y se compararon sus fenotipos con aquellos del mutante *cbrB*.

4.6.3.1. Construcción del mutante de delección de Δ *crcZ*

Para la construcción del mutante *crcZ* se usó el plásmido pKNG Δ *crcZ*Tc (Moreno y col., 2012) que deletionaba el RNA pequeño y su promotor sustituyéndolos por un gen de resistencia a tetraciclina mediante intercambio alélico. Se comprobó la ausencia del alelo *crcZ* silvestre y la presencia del alelo Δ *crcZ*::*tet* por PCR así como por *southern blotting* en diferentes candidatos, de los cuales se seleccionó el denominado MPO456 para su posterior caracterización.

4.6.3.2. Análisis del crecimiento del mutante MPO456 (Δ crcZ) en condiciones de represión y no represión catabólica

Se comparó la capacidad de crecimiento de Δ crcZ con la de la estirpe silvestre en medios donde se ejerce represión catabólica vía Crc (LB y arginina) y medios libres de represión (succinato y citrato). Para ellos se cultivaron las dos estirpes en medio LB o medio mínimo con arginina, succinato o citrato como fuente de carbono y se monitorizó el crecimiento a 30 °C a lo largo de 24 horas. En la Figura 67 se representa el crecimiento de ambas estirpes en los cuatro medios. El crecimiento de ambas estirpes fue idéntico al del silvestre en los cuatro medios analizados, por lo que la carencia de CrcZ no parecía afectar la asimilación de estos compuestos. Un estudio reciente en *P. putida* ha descrito que en mutantes simples *crcZ* o *crcY*, los niveles un RNA pequeño compensan la ausencia del otro (Moreno y col., 2012) y es posible que en el caso del crecimiento, CrcY efectivamente pueda estar supliendo una carencia provocada por la mutación *crcZ*.

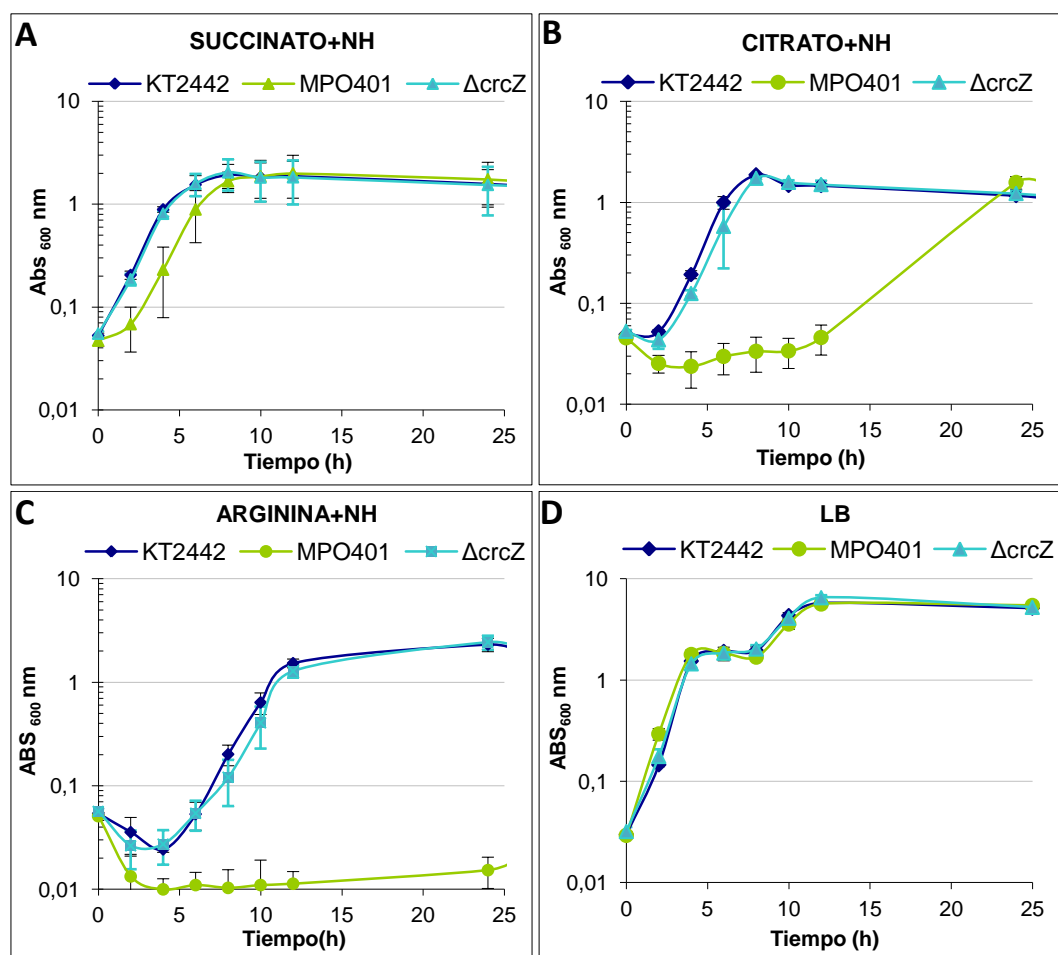


Figura 67. Análisis del crecimiento de las estirpes silvestre y mutante Δ crcZ en un medio mínimo con distintas fuentes de carbono. Curvas de crecimiento, medido como aumento de la densidad óptica a 600 nm (ABS₆₀₀) del cultivo a lo largo del tiempo de *P. putida* KT2442 (silvestre) y mutante *crcZ* (MPO456) en medio LB (panel A) o mínimo con amonio como fuente de nitrógeno y succinato (panel B), citrato (panel C) o arginina (panel D) como fuente de carbono.

5. DISCUSIÓN

El sistema CbrAB ha sido descrito en diversas especies del género *Pseudomonas* como un regulador del metabolismo y transporte de determinados aminoácidos. Hasta la fecha se había estudiado el papel regulador del sistema Cbr sobre rutas específicas de utilización o transporte de aminoácidos, como es el caso de arginina (Nishijyo y col., 2001; Li y Lu, 2007) o histidina (Zhang y Rainey, 2007, 2008). En esta Tesis se ha caracterizado además, el papel de CbrB como regulador global que participa en otros procesos fisiológicos de adaptación de *P. putida* a distintas condiciones ambientales. Los datos de transcriptómica mostraron que CbrB no sólo controla la asimilación de ciertos aminoácidos como fuente de carbono, sino que parece controlar también otros procesos celulares de especial relevancia, que podrían permitirle a la bacteria adaptarse a condiciones ambientales cambiantes. Además se comprobó que CbrB, que pertenece a la familia tipo NtrC y activa promotores dependientes del factor σ^N , ejerce, de forma directa o indirecta, un control negativo sobre determinados genes.

El análisis de la expresión global de una estirpe *ntrC* en comparación a un mutante *cbrBntrC* (Cbr^+ vs. $CbrB^-$, en ausencia de NtrC) reveló que 122 genes estaban expresados de forma diferencial de acuerdo a los criterios de selección empleados. De éstos, 72 genes tenían una expresión más alta en el doble mutante *cbrBntrC*, y 50 genes tenían una expresión más alta en el mutante *ntrC*, indicando de nuevo la función represora de este regulador. Se identificaron 37 genes comunes a ambas aproximaciones, 21 más expresados en las estirpes *cbrB^+* y 16 más expresados en aquellas carentes de CbrB. Con este análisis preliminar sin desgranar cada gen por separado, se podía esbozar una función reguladora amplia para CbrB en *P. putida*, donde no sólo controlaría rutas catabólicas para distintas fuentes de carbono, o su transporte, si no que tendría una posición privilegiada en la jerarquía de regulación de la célula. El análisis más detallado de cada uno de los genes con expresión diferencial entre los dos fondos genéticos permitió la agrupación en 5 categorías distintas, en función al proceso/s en los que intervinieran. Las categorías asignadas fueron las siguientes:

- Grupo 1: Transporte y metabolismo de aminoácidos
- Grupo 2: Transporte/ metabolismo de fuentes de carbono no nitrogenadas
- Grupo 3: Genes relacionados con movilidad y quimiotaxis
- Grupo 4: Genes relacionados con la respuesta a estrés
- Grupo 5: Genes con función reguladora
- Grupo 6: Otros genes

5.1. El papel de CbrB en la la regulación del metabolismo de carbono en *Pseudomonas putida*

En el **grupo 1** se agruparon los genes relacionados con el **transporte/ catabolismo de aminoácidos**. En esta categoría se englobaron 9 genes que codificaban transportadores de aminoácidos, todos más expresados en un fondo silvestre salvo *arcD*, que tenía mayor expresión en un fondo *cbrB*. De los 9 genes, 7 estaban anotados como transportadores generales de aminoácidos, mientras *gltP* (PP0137) y *arcD* (PP1001) estaban anotados como un transportador de glutamato/ aspartato y un antiportador de arginina/ ornitina, respectivamente. Ello indica que la disponibilidad de al menos algunos aminoácidos como fuente externa de nutrientes puede estar reducida en los mutantes carentes de CbrB. Además de los genes de transporte, se identificaron 16 genes que intervenían en rutas catabólicas de aminoácidos, en concreto en las rutas de arginina/ ornitina, histidina, glutamato/ glutamina, aspartato/ asparragina, leucina, isoleucina, valina y glicina, lo que de indica que CbrB está regulando no solo la disponibilidad de aminoácidos, sino también su capacidad de metabolización. De los 16 genes, 11 tenían una expresión menor en un fondo *cbrB*, mientras 5 se expresaban más en esta estirpe. El conjunto de genes con expresión diferencial en un medio que contenía L-aminoácidos como fuente de carbono y nitrógeno, se representan en la Figura 65.

El análisis del crecimiento de un mutante *cbrB* en un medio mínimo que contenía **histidina** como fuente de carbono reveló que era incapaz de utilizarla, aunque sí fue capaz de usarla cuando era utilizada como fuente de carbono y nitrógeno (Figura 9). La diferencia principal entre estos dos medios es que el sistema Ntr se encuentra activo en el segundo caso, mientras que no lo está cuando la histidina se usa como fuente de carbono, ya que hay un exceso de nitrógeno. Estos datos sugieren que NtrC podría estar supliendo la función de CbrB, en condiciones de limitación de nitrógeno en las que se requiere utilizar histidina como fuente de este nutriente. En ausencia de ambos sistemas, Cbr y Ntr, la histidina no pudo ser usada como fuente de carbono en ninguno de los casos. Paradójicamente, en un medio con carbono y nitrógeno limitante, los mutantes simples *cbrB* y *ntrC* crecieron de forma más eficiente que la estirpe silvestre. Esto podría indicar cierta interferencia entre los sistemas cuando ambos se encuentran activos, que podría ser reflejo de un solapamiento en las secuencias promotoras de los genes de asimilación de histidina, o cualquier otro efecto por determinar. Por otro lado, la utilización de histidina como fuente de nitrógeno parece ser independiente de los sistemas Cbr y Ntr, si bien se detecta un cierto retraso en el crecimiento del doble mutante *cbrBntrC* en condiciones de limitación de nitrógeno.

El análisis transcriptómico de un fondo silvestre frente a un fondo *cbrB*, reveló que 3 de los 5 genes que forman el operón *hut* de utilización de histidina en *P. putida* (*hutU*, *hutH* y *hutG*) tenía una expresión más alta en el fondo silvestre, indicando un control positivo por parte de CbrB. Estos datos

de expresión correlacionan con un defecto en el crecimiento de un mutante *cbrB* en histidina como fuente de carbono. En *P. fluorescens* la expresión del operón catabólico *hut* es activada por CbrB, se anula en un mutante *rpoN* (carente del factor σ^N) cuando se utiliza histidina como fuente de nitrógeno y ambos mutantes son incapaces de utilizar histidina como fuente de carbono y nitrógeno (Zhang y Rainey, 2007, 2008). Los autores describieron sitios de inicio de transcripción diferentes en función de si se utilizaba histidina como fuente de carbono (con un posible promotor dependiente de σ^N localizado *in silico* a 14 nucleótidos) o de nitrógeno (con una secuencia similar a promotores σ^{70} a la distancia adecuada). CbrB activaría la expresión del operón *hut* cuando la histidina es fuente de carbono, con el consecuente reclutamiento del factor σ^N , mientras bien CbrB o NtrC podrían activarla, presumiblemente de forma indirecta, cuando fuera empleada como fuente de nitrógeno,. En *S. typhimurium* y *K. aerogenes*, la expresión del operón *hut* se activa cuando la histidina se usa como fuente de carbono o de nitrógeno. Cuando se usa como fuente de carbono, la transcripción del operón *hut* es activada por la proteína CRP (Catabolite Repression Protein), cuando lleva unido cAMP (Nieuwkoop y col., 1984). Sin embargo, cuando es utilizada como fuente de nitrógeno, la transcripción del operón *hut* es activada por la proteína adaptadora de control de la asimilación de nitrógeno NAC desde un promotor σ^{70} , cuya expresión es controlada por el TCS NtrBC de forma dependiente de σ^N (Bender, 1991; Janes y col., 2003). Sin embargo, *P. putida* carece de una proteína adaptadora similar a Nac y se ha observado que genes de *P. putida* homólogos a los activados por Nac en *E. coli* son activados directamente por NtrC de forma dependiente de σ^N (Hervas y col., 2009). Un modelo análogo al de enterobacterias o *P. fluorescens* podría funcionar en *P. putida*, con una activación directa de los genes de utilización de histidina dependiente de CbrB, o NtrC en su defecto, y σ^N (carbono) o indirecta a través de un activador transcripcional de promotores σ^{70} cuya expresión fuera dependiente de CbrB y/o NtrC (nitrógeno).

Los análisis de crecimiento de *P. putida* en un medio que contenía **arginina** u **ornitina** como fuente de carbono o carbono y nitrógeno o sólo de carbono revelaron que los mutantes *cbrB* y *cbrBntrC* eran incapaces de utilizar la arginina u ornitina como fuente de carbono o carbono y nitrógeno, lo que indica la participación de CbrB en la asimilación y/o transporte de dichos compuestos. La asimilación de arginina como fuente de nitrógeno resultó ser independiente del sistema Ntr, mientras que la asimilación de ornitina resultó afectada en un fondo *ntrC* y *cbrBntrC*, lo que indicaba la participación de NtrC en la asimilación de ornitina como fuente de nitrógeno. Estos datos indicarían que la utilización de arginina/ ornitina es estrictamente dependiente de CbrB cuando es la única fuente de carbono disponible, que NtrC participaría en la regulación de la utilización y/o transporte de ornitina como fuente de nitrógeno y que CbrB podría suplir parcialmente en dicha función.

Los datos obtenidos mediante transcriptómica manifestaron una mayor expresión en el fondo *cbrB* de un gen que codifica para una ornitina ciclodeaminasa (PP3533, anexo, tabla S2) mientras que la expresión de PP0864, que codifica una ornitina decarboxilasa, estaba reducida en un fondo mutante (ver figura 64). De este modo, se puede postular que CbrB reprime la utilización de ornitina para sintetizar prolina a través de la ornitina ciclodeaminasa (PP3533), y activa la transformación de ornitina en putrescina, a través de la ornitina decarboxilasa (PP0864). Adicionalmente, se detectó mayor expresión en los fondos genéticos *cbrB*⁻ del antiportador de arginina/ ornitina codificado por PP1002, evidenciando que el transporte de estos aminoácidos podría estar alterado en ausencia de CbrB funcional. El defecto de crecimiento de las estirpes *cbrB* y *cbrBntrC* cuando arginina era empleada como fuente de carbono o de carbono más nitrógeno fue muy severo, sin embargo sólo un gen perteneciente a una ruta de utilización de arginina (*arcA*, PP1001), que codifica una arginina deaminasa perteneciente a la ruta ADI, principal vía de producción de citrulina y ornitina, mostró una expresión diferencial entre los fondos genéticos mutantes y las estirpes con el alelo CbrB silvestre. Como ya se ha mencionado. Esto puede ser debido a la existencia de múltiples rutas catabólicas en las Pseudomonas. En *P. putida* la arginina puede ser asimilada por cuatro rutas de utilización diferentes (figura 68) mientras en *P. aeruginosa* existen al menos tres (Haas y col., 1984; Stalon y Mercenier, 1984; Jann y col., 1986; Tricot y col., 1991). Se ha descrito que en la mayoría de las estirpes que poseen la ruta AST (arginina-succinil transferasa) el catabolismo de **ornitina** como fuente de carbono comienza a través de la conversión de ornitina en succinil-ornitina a través de una succinil-transferasa. Sin embargo *P. putida* utiliza ornitina a través de una ruta que usa prolina como intermediario e implica la actividad de una ornitina ciclasa. Además, la ornitina puede ser transformada a putrescina mediante una ornitina decarboxilasa. Sin embargo, la utilización de ornitina como fuente de carbono mediante esta ruta es poco probable puesto que mutantes en la utilización de putrescina aún podían utilizar ornitina.

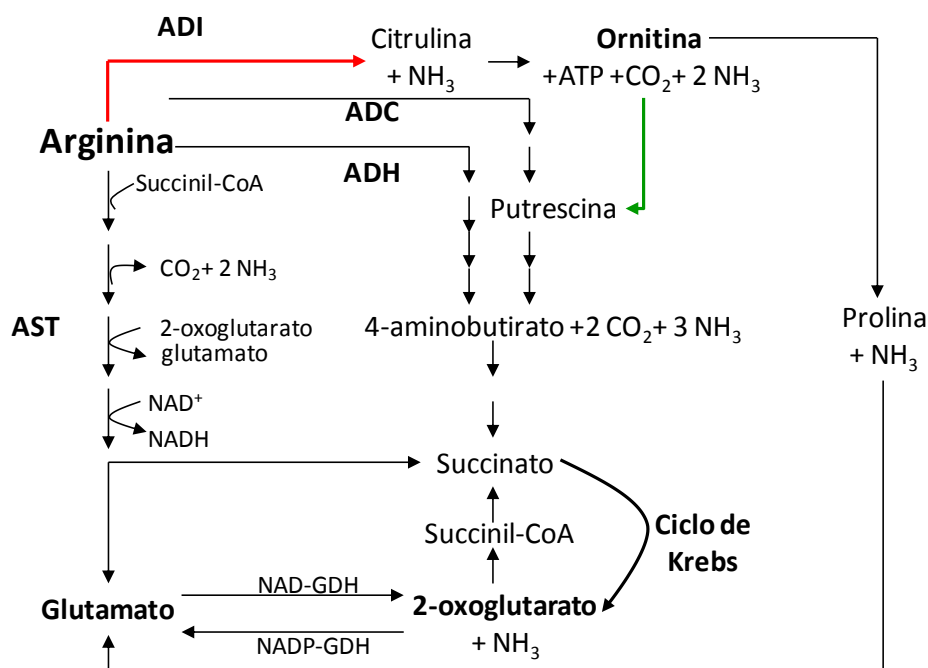


Figura 68. Rutas de asimilación de arginina y ornitina en *P. putida*. Se muestran las cuatro rutas descritas para el catabolismo de arginina en *P. putida*: AST, arginina succinil-transferasa; ADH, arginina dehidrogenasa; ADC, arginina decarboxilasa; ADI, arginina deaminasa. En rojo se muestra la reacción catalizada por la ornitina ciclodeaminasa y en verde la de la ornitina decarboxilasa. Modificado de (Park y col., 1997).

Adicionalmente, mutantes afectados en la utilización de **prolina** resultaron estar afectados también en la utilización de ornitina como fuente de carbono (Tricot y col., 1991) lo que pone de manifiesto la importancia de esta vía de utilización de ornitina alternativa a la vía de la putrescina. La ornitina y la prolina son compuestos intermediarios en la ruta de utilización de citrulina, y la actividad ornitina ciclasa (PP3533 en *P. putida*), que transforma la ornitina en prolina (y viceversa), se induce durante el crecimiento en citrulina (Stalon y col., 1987). De esta manera, el catabolismo de citrulina en *P. putida* podría estar mediado por una ornitina carbamoiltransferasa catabólica, que forma parte de la ruta ADI (arginina deaminasa) (Stalon y Mercenier, 1984). Además, parte de la arginina podría ser convertida a citrulina u ornitina a través de esta ruta incluso en condiciones aeróbicas gracias a la actividad ornitina ciclasa, como sugiere la inducción de esta enzima en células cultivadas en arginina.

También se ha documentado en la bibliografía que CbrB activa la expresión del operón *aotJ-argR* en *P. aeruginosa*, que codifica un transportador de arginina/ornitina y el regulador de la utilización de arginina ArgR (Nishijyo y col., 1998). Además, la mutación *cbrB* provocó además niveles reducidos de varias enzimas de la ruta AST en esta estirpe. Sin embargo, ningún gen involucrado en la ruta AST fue detectado por los análisis de transcriptómica en *P. putida*. Así, las diferencias en el catabolismo de arginina u ornitina descritas en la bibliografía podrían explicar las diferencias fenotípicas entre nuestros mutantes *cbrB*, *ntrC* y *cbrBntrC* al utilizar arginina u ornitina

como fuentes de carbono o nitrógeno. Sin embargo, CbrB podría estar regulando el transporte de arginina más que su catabolismo en *P. putida*.

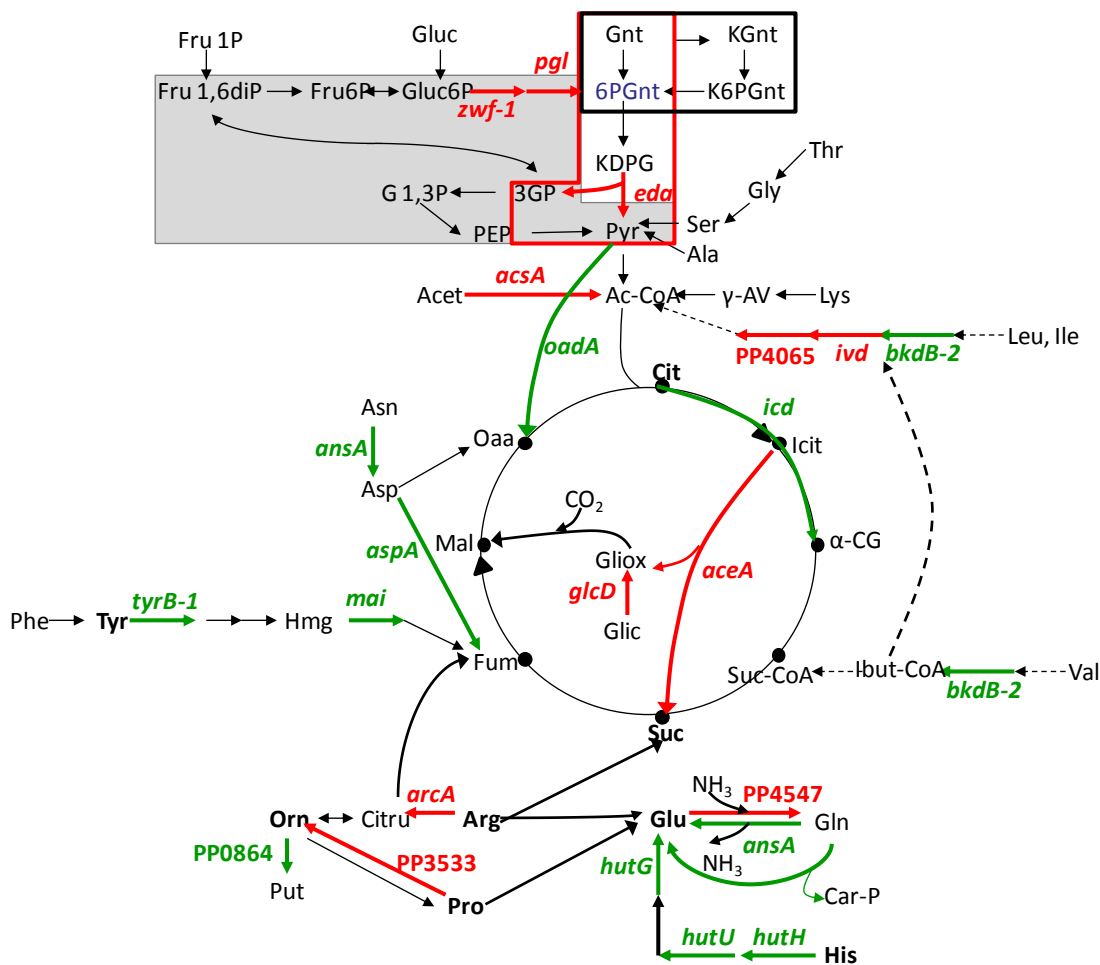
El análisis del crecimiento de *P. putida* y los mutantes isogénicos en un medio que contenía **tirosina** revelaron que los mutantes *cbrB* y *cbrBntrC* no eran capaces de usarla como fuente de carbono (Fig. 12). Además, el mutante *cbrB* vio ralentizado su crecimiento cuando usaba tirosina como fuente de nitrógeno mientras los mutantes *ntrC* y *cbrBntrC* exhibieron tasas de crecimiento aún más bajas. A diferencia de los otros aminoácidos analizados, estos datos indican que CbrB es estrictamente necesario para usar tirosina como fuente de carbono, no pudiendo ser suplido por NtrC, pero que su utilización como fuente de nitrógeno es parcialmente dependiente de CbrB y de NtrC.

En *P. putida* el catabolismo de tirosina se inicia con la transaminación de la **tirosina** al 2-oxoglutarato para producir glutamato y 4-hidroxi-fenilpiruvato. A continuación, la enzima Hpd, con actividad dioxigenasa, realiza la conversión hasta homogentisato, y finalmente las actividades HmgABC convierten de este intermediario en fumarato (derivado al ciclo de Krebs) y acetoacetato (Arias-Barrau y col., 2004). Los análisis de microarrays mostraron que los genes *tyrB-1* (PP1972) y *mai* (PP4619) presentaban menor expresión en el fondo *cbrB* (figura 69), y por lo tanto se encontraban activados por CbrB. Mientras *tyrB-1* codifica la primera enzima de la ruta de utilización de tirosina, *mai* (o *hmgB*) interviene en la utilización de homogentisato. El control positivo de *tyrB-1* podría causar la deficiencia del crecimiento del mutante *cbrB* cuando la tirosina se utiliza como fuente de carbono o de nitrógeno. Estos resultados sugieren que CbrB y NtrC podrían regular de forma coordinada la utilización de tirosina, a diferencia de otros aminoácidos donde podría existir interferencia entre ambos sistemas.

La utilización de **glutamato** por el mutante *cbrB* no se vió drásticamente afectada en ninguna de las condiciones, bien sea utilizado como fuente de carbono o de nitrógeno. Sin embargo, el mutante *ntrC* sí experimentó una ralentización del crecimiento cuando lo usaba como fuente de nitrógeno. Dos genes que intervienen en las conversiones entre glutamato y glutamina mostraron expresión alterada en sentido contrario en los análisis de expresión global: PP4547 y *ansA*. Mientras el primero codifica una aminotransferasa que cataliza la conversión de glutamato a glutamina por la incorporación de una molécula de amonio, *ansA* realiza la reacción contraria, incorporando un grupo amino de la glutamina a aspartato, produciendo glutamato y asparragina. La primera reacción estaría reprimida mientras la segunda sería activada por CbrB. El gen *gltP* (PP0137), que codifica un transportador de glutamato/aspartato, mostró una menor expresión en un fondo *cbrB*, lo que podría indicar que CbrB regula el transporte de glutamato en *P. putida*.

El fenotipo observado en **prolina** merece especial mención. La lenta utilización de prolina como fuente de carbono por el mutante *cbrB* sugiere que el sistema Cbr estaría regulando en algún punto la utilización de prolina. Cuando era empleada como fuente de nitrógeno, ninguno de los mutantes *cbrB* o *ntrC* veía afectado su crecimiento en comparación con la estirpe silvestre. Sin embargo, el doble mutante *cbrBntrC* si presentó un retraso en el crecimiento en estas condiciones, indicando que ambos sistemas de control podrían estar supliendose en condiciones de limitación de nitrógeno. De forma coherente a lo anterior, en condiciones de exceso de nitrógeno en las que NtrC se encuentra inactivo, solamente se ve afectado en el crecimiento el mutante *cbrB*, aunque hay que destacar que lo está de forma menos severa que el doble mutante *cbrBntrC*. Este mismo efecto se observa cuando la prolina se utiliza como fuente de carbono y nitrógeno.

En Enterobacterias y en *Pseudomonas* se han descrito dos genes esenciales para el metabolismo de prolina: *putP* y *putA* (Maloy, 1987; Vilchez y col., 2000a; Vilchez y col., 2000b; Nakada y col., 2002). Mientras *putP* es un transportador de prolina acoplado al transporte de sodio, PutA es una proteína multifuncional que cataliza la conversión de prolina a glutamato en dos pasos enzimáticos y también actúa como represor en la expresión de los genes *put*. Ramos y colaboradores (2000) propusieron un modelo para la utilización de prolina en *P. putida* donde un análogo de NtrC activaría la expresión a través de un regulador transcripcional intermedio que activa promotores dependientes de σ^N (Vilchez y col., 2000a). En presencia de prolina PutA se une a ella y cambia su conformación, permitiendo unirse a determinados sitios en la membrana que posibilita su estado enzimáticamente activo. Sin embargo, en ausencia de prolina, PutA se mantiene unida a DNA, reprimiendo consecuentemente los genes *put*. La actividad prolina deshidrogenasa además es dependiente de FAD, y por tanto, del estado redox del mismo, de modo que aunque la proteína estuviera localizada en la membrana, sin FAD disponible ésta no podría catalizar las conversiones enzimáticas (Menzel y Roth, 1981a; b; c; Maloy y Stewart, 1993). Sin embargo, en nuestro análisis transcriptómico en *P. putida* no se ha detectado expresión diferencial de estos genes de utilización de prolina, lo cual no descarta la posible implicación de CbrB en el proceso de control transcripcional de los genes *put*.



Figura

Figura 69. Genes regulados por CbrB involucrados en el metabolismo de aminoácidos y otras fuentes de carbono. Se muestran los genes catabólicos pertenecientes a los grupos 1 y 2 del análisis transcriptómico que mostraron expresión diferencial en el mutante *cbrB* y/o *cbrB ntrC*. Los genes reprimidos por CbrB se muestran en rojo, mientras los activados por CbrB se presentan en verde (ver tabla 4 del anexo).

Además de los aminoácidos estudiados en esta tesis, se hallaron genes con expresión diferencial que pertenecían a rutas metabólicas de otros aminoácidos (figura 69): *ansA* y *aspA* del metabolismo de asparragina/ aspartato, *bkdB-2*, *PP4065* e *ivd* del metabolismo de valina, leucina e isoleucina (tabla suplementaria 4), sugiriendo que la utilización de estos aminoácidos también podría estar controlada por CbrB en *P. putida*.

Cuando se estudió la utilización de otras fuentes de carbono distintas a los aminoácidos, se observó que las estirpes *cbrB* y *cbrBntrC* no fueron capaces de utilizar citrato como fuente de carbono. La causa de esta deficiencia no está clara, aunque probablemente se deba a la falta de incorporación del citrato externo (ver más adelante) más que a una incapacidad de utilizarlo, puesto que el citrato entra directamente en el ciclo TCA al igual que el succinato y si no se metabolizase, el ciclo de Krebs se interrumpiría y tendría un efecto pleiotrópico, independientemente de la naturaleza de la fuente de carbono. Sin embargo, hay que destacar que en los experimentos de transcriptómica

se detectó una expresión más elevada en el mutante *cbrB* de la enzimas isocitrato liasa, mientras la expresión era menor para la isocitrato dehidrogenasa. Mientras la primera favorece el ciclo del glioxilato, la segunda participa en el ciclo de Krebs mediando la conversión de citrato a 2-oxoglutarato en dos reacciones, y quizá un cambio en la vía de metabolización del citrato vía glioxilato pueda alterar su capacidad de uso. Por otra parte, recientemente se ha descrito que un mutante carente de los pequeños RNAs CrcZ y CrcY, al igual que un mutante *cbrB*, es incapaz de utilizar citrato como fuente de carbono (Moreno y col., 2012), aunque desconocemos si existe relación entre ambos eventos. Esta cuestión se discutirá en el apartado 5.4.

La clasificación de genes mediante el análisis de microarrays pertenecientes al **grupo 2: Transporte/ metabolismo de fuentes de carbono no nitrogenadas** permitió identificar 20 genes (Anexo, tabla S2). 17 de ellos estaban sujetos a un control positivo por parte de CbrB ya que presentaron una expresión más baja en un fondo *cbrB*. Solamente *benC* (PP3169), *oad* (PP5346) e *icd* (PP4012) presentaron una expresión más alta en un fondo silvestre, y por lo tanto estaban reprimidos por CbrB. De los genes pertenecientes a este grupo, dos de ellos, con regulación opuesta, participan en los ciclos de Krebs (*icd*, PP4012) y del glioxilato (*aceA*, PP4116), respectivamente, dos en el transporte de fuentes de carbono (*dctP*, PP1169; *rbsB*, PP2454) y tres en la utilización de azúcares a través de la principal ruta catabólica en *P. putida* Entner-Doudoroff (*zwf-1*, *pgl* y *eda*, PP1022-PP1024).

Además de los anteriores, también se detectó una expresión más elevada en el fondo *cbrB* de los genes *acsA*, cuyo producto convierte acetoacetato en acetil-coA, *glcD* que codifica una enzima que convierte glicolato a glioxilato (Figura 69), y el gen *fruR*. El ortólogo de *fruR* en *E.coli* codifica la proteína Cra, que está implicada en represión catabólica controlando el flujo de carbono a través de diversas rutas metabólicas (Ramseier, 1996; Saier, 1996), lo cual puede suponer de nuevo un nexo entre represión catabólica y el sistema CbrB.

Algunos de los genes detectados en este grupo (PP0792, PP1024, PP2454, PP3122, PP4737 y PP5346, en la tabla S5 del Anexo), se han descrito como sujetos a control traduccional por Crc (Collier y col., 1996; del Castillo y col., 2007; Moreno y Rojo, 2008). Sonnleitner y colaboradores han descrito una conexión entre el sistema Cbr y la represión catabólica ejercida por Crc en *P. aeruginosa*. CbrB activa la transcripción del pequeño RNA CrcZ, que en su estructura secundaria contiene dominios que mimetizan los sitios de reconocimiento de Crc en sus mRNA diana, y la unión al mismo provoca su inactivación. Cuando se encuentra activo, Crc reprime la traducción de los mRNAs diana que controla mediante unión a una secuencia en el RNA próxima al AUG (Sonnleitner y col., 2009). Sin embargo, esta conexión no podría ser detectada mediante un abordaje transcriptómico puesto que Crc ejerce un control a nivel traduccional, por lo que CbrB podría estar regulando estos genes a dos niveles: un

nivel transcripcional estos genes y un nivel traduccional indirecto al modular la acción del represor traduccional a través de la producción de los pequeños RNAs.

Para buscar posibles dianas adicionales de la regulación ejercida por CbrB sobre el metabolismo del carbono y nitrógeno, se realizó un análisis fenotípico de *P. putida* KT2442 y mutante *cbrB* (MPO406) mediante *Phenotype microarrays* (Biolog inc.). El mutante *cbrB* mostró una deficiencia en el crecimiento en 9 fuentes de carbono distintas, entre las que se encontraba la etanolamina, que fue la que mostró mayores diferencias de actividad metabólica (Tabla 6). El análisis del crecimiento mostró que este compuesto sólo puede ser utilizado como fuente de nitrógeno por *P. putida* (no mostrado). Aunque no se observaron diferencias en el crecimiento de las estirpes silvestre y mutante *cbrB* (MPO406), en los análisis de microarrays si que se detectó el gen PP0542, que codifica una amonio liasa de etanolamina, y se encontraba activada por CbrB (Anexo, tabla S2). Los análisis de *Phenoarrays* también discriminaron el ácido 5-oxoglucónico, involucrado en la ruta de las pentosas fosfato, el ácido butírico o γ -aminobutírico, que es un intermediario del metabolismo de arginina y ornitina, como compuestos metabolizados de forma distinta entre las estirpes silvestre y mutante *cbrB*. También se detectó el ácido glutámico o glutamato, que participa en el metabolismo del nitrógeno, aunque el análisis detallado de crecimiento en cultivo líquido descartó una implicación de CbrB en la utilización de glutamato como fuente de carbono o nitrógeno (figura 14). Por último, se encontraron diferencias en actividad metabólica con ribono-1,4-lactona y ácido D-glucurónico, un monosacárido de oxidación de la ribosa y compuesto del metabolismo de aminoazúcares y nucleótidos, del almidón y sacarosa, respectivamente. Además el mutante redujo su actividad metabólica cuando determinados dipéptidos eran utilizados como fuente de nitrógeno.

Finalmente, cuando se comparó el crecimiento de los mutantes MPO406 (inserción miniTn5-*luxA-Km* en *cbrB*) y MPO401 (delección $\Delta cbrB$), ambos exhibieron un patrón de crecimiento igual en los medios analizados: LB y medio mínimo con succinato, citrato, arginina, ornitina, prolina, tirosina y glutamato como únicas fuentes de carbono. Estos resultados indican que tales defectos son provocados por la carencia de la proteína CbrB, que se postula como un regulador global de compuestos carbonados en *P. putida* que ejerce función activadora.

5.2. Efecto regulador de CbrB sobre otros procesos celulares

Además de involucrado en la asimilación de diversos aminoácidos como fuentes de carbono o carbono y nitrógeno, los resultados de transcriptómica mostraron la implicación del sistema Cbr en el control de otros procesos celulares, como la alteración de la movilidad, participación en la homeostasis del hierro, la respuesta a diversos estreses, o la transición de vida sésil a planctónica en *P. putida*.

5.2.1. CbrB y la movilidad en *P. putida*

El análisis fenotípico de las estirpes de *P. putida* permitió describir que el mutante *cbrB* sufría una reducción de la movilidad en ensayos tanto de *swimming* como de *swarming*, en comparación con la estirpe silvestre. Además, y de forma complementaria a estos fenotipos, los estudios de transcriptómica permitieron detectar la expresión alterada de algunos genes que se agruparon dentro del denominado **grupo 3: Genes relacionados con adhesión celular, movilidad y quimiotaxis**. Dentro de este grupo se encontraron genes implicados en la síntesis del flagelo y su ensamblaje (PP4377, PP4378 y PP4383) así como de otras proteínas potencialmente involucradas en el proceso de quimiotaxis (PP0320, PP4333 y PP1371). Una expresión limitada de cualquiera de estos genes puede, en principio explicar la movilidad reducida del mutante CbrB.

Una limitación de componentes del flagelo reduce el número de flagelos y, como consecuencia su movilidad, por lo que la reducción de componentes flagelares podría explicar el fenotipo de movilidad. La tinción de flagelo y los ensayos de inmunofluorescencia contra FliC, principal flagelina, pusieron de manifiesto que el mutante MPO406 estaba produciendo flagelo y aparentemente tan abundante como la estirpe silvestre. Sin embargo, no puede descartarse que la estructura del mismo sea distinta o que, aunque estructuralmente similar al del silvestre, pueda sufrir algún defecto en el componente motor. Para ello se requerirían técnicas de mayor resolución como la microscopía electrónica u observaciones a tiempo real mediante microscopía para evaluar el movimiento.

Por otra parte, la movilidad reducida del mutante *cbrB*, podría ser debido a una respuesta quimiotáctica alterada que evita que el mutante pueda nadar (*swimming*) o moverse coordinadamente en superficie (*swarming*) de forma eficiente hacia microambientes que proporcionarían condiciones óptimas para el crecimiento y la supervivencia, como evidencian otras mutaciones quimiotácticas (Kato y col., 1999; Ames y col., 2002; Barken y col., 2008). El sistema quimiotáctico ha sido ampliamente caracterizado en *E. coli* y *S. typhimurium*. La expresión de los genes que codifican los productos relacionados con la quimiotaxis en estas bacterias está regulada por una cascada de fosforilación, donde la quinasa CheA se autofosforila en respuesta a un repelente, y fosforila a los elementos reguladores de respuesta CheY y CheB. Otras proteínas Che también participan en este sistema, y mutaciones en las estas alteran la tendencia horaria/antihoraria de los motores. Por ejemplo, CheR y CheB añaden y eliminan, respectivamente, los grupos metilo de las MACPs, que son los que haciendo volver al sistema a un estado de señalización anterior al estímulo recibido (Macnab, 1996). Las MACPs juegan un importante papel en el proceso de quimiotaxis bacteriana. Estas proteínas transmembrana están sujetas a la metilación y

demetilación continua en ausencia de estímulo, para mantener un nivel basal de metilación (Kort y col., 1975). Mientras los atrayentes provocan un incremento en el nivel de metilación, los repelentes ocasionan un descenso del mismo. El mecanismo que conlleva a estas variaciones subyace en la actividad metil-transferasa o metil-esterasa (Springer y Koshland, 1977; Stock y Koshland, 1978), que provocan metilación o demetilación de las MACPs, respectivamente. Una proteína importante en este sistema es CheW, que acopla la actividad de autofosforilación de CheA con las MACPs, formando un complejo ternario de señalización. Recientemente se describió que para la formación del complejo ternario era necesaria la previa formación de trímeros entre las moléculas de MACPs, que ocurre a través de sitios que solapan con los aquellos de unión de CheW. La estequiometría entre los componentes de este complejo parece crucial, puesto que niveles elevados de CheW provocan una disrupción de la capacidad quimiotáctica, debido a la saturación de los sitios en las MACPs, evitando la formación de trímeros en estas proteínas (Cardozo y col., 2010). De esta manera, un sistema quimiotáctico alterado tendrá como consecuencia un movimiento alterado, y será defectuoso a la hora de responder a señales ambientales positivas o negativas. Los ensayos de *microarrays* realizados en *P. putida* detectaron tres genes de quimiotaxis con expresión diferencial: PP0320 (más expresado en mutante *cbrB*) y PP1371 (más expresado en mutante *ntrC*), que son MACP (*methyl-accepting chemotaxis proteins*), y PP4333, que tiene un dominio CheW (más expresado en *cbrB ntrC*), como se resume en la, tabla S4. Estos cambios en la expresión podrían conllevar una estequiometría alterada de los componentes del complejo quimiotáctico, que a su vez podría explicar el fenotipo de movilidad reducida.

En cualquier caso, independientemente del mecanismo subyacente, estructural o quimiotáctico, es inequívoco que la mutación *cbrB* altera la capacidad de las bacterias para migrar hacia otros nichos de la forma más adecuada.

5.2.2. La regulación de la respuesta a estrés ejercida por CbrB

El análisis transcriptómico permitió clasificar una serie de genes dentro del denominado **grupo 4: Genes relacionados con la respuesta a estrés**. En este grupo se incluyeron distintos miembros del sistema de respuesta a choque térmico, incluidos chaperonas (*groES-groEL*, *grpE*) y el proteasoma HslVU, junto con las enzimas involucradas en el sistema de respuesta a daño oxidativo como SodB. Todos ellos presentaron una expresión más alta en un fondo silvestre y por lo tanto estaban sujetos a un control positivo por parte de CbrB. Es posible que CbrB pudiera estar mediando una respuesta general a estrés promovida por una limitación de nutrientes, daño oxidativo o una

señal de estrés desconocida hasta el momento. La sensibilidad de una estirpe silvestre y mutante frente a tratamientos con agua oxigenada y paraquat, que inducen respuesta a distintos estreses, no permitió distinguir diferencias de sensibilidad entre las estirpes. Sin embargo, sí que fue posible distinguir diferencias de sensibilidad a la presencia de metales pesados o condiciones de limitación de hierro. En relación con la sensibilidad a cobre, los datos de *microarrays* habían detectado una expresión mayor de los genes *copS* y *copR* en el mutante *cbrB ntrC*. En *P. aeruginosa*, el sistema de dos componentes CopRS participa en procesos de homeostasis del cobre, mediante la activación transcripcional del operón *copABCD* (Teitzel y col., 2006). Sin embargo, parece que en *P. putida* CopA y CopB no están involucrados en dicha homeostasis, ya que inserciones en *copA* y *copB* mostraron sólo un ligero incremento en la tolerancia a cobre, (Adaikkalam y Swarup, 2005). La mayor tolerancia al cobre por parte del mutante *cbrB* en *P. putida* en comparación con la estirpe silvestre podría aún estar relacionada con la expresión alterada de *copR* y *copS*, pero este par regulador podría ejercer su efecto por la activación de otros operones aún sin identificar. Teitzel y col. (2006) identificaron el regulón para la respuesta adaptada a cobre en *P. aeruginosa*, describiendo que, entre otros genes, *copRS*, y proteínas transportadoras de unión a cationes (P-type ATPases) aumentaban su expresión en respuesta a cobre. Además, se observó una disminución de la expresión de varias porinas de membrana externa de la familia OprD (Teitzel y col., 2006). En nuestros análisis transcriptómicos también se identificaron genes de este tipo: *copR*, *copS*, PP4261 (P-type ATPase), más expresados en la estirpe *cbrB*, así como 4 porinas de membrana externa de la familia OprD, *oprQ* (PP0268), *oprH* (PP1182), PP0883 y PP3764, todas menos expresadas en estirpes *cbrB*, excepto la última. Es significativo que no solo *copRS* sino otros genes que responden a una respuesta adaptativa a la presencia de cobre (*P. aeruginosa*) muestren también expresión diferencial por la mutación *cbrB*.

La conexión de la tolerancia a zinc y CbrB es menos obvia ya que no se detectó expresión alterada de ningún gen que pudiera estar involucrado en tal proceso, aunque los genes *copRS* de *P. aeruginosa* inducen tanto la resistencia a cobre como a zinc (Caille y col., 2007). En primer lugar, esto conectaría el fenotipo de resistencia zinc de los mutantes *cbrB* descrito en el apartado 3.2 y 5.3.2 con la expresión alterada del operón regulador y en segundo, pone de manifiesto que *copRS* puede regular operones de resistencia a metales distintos de *copABCD*.

Adicionalmente, en esta categoría se incluyeron genes potencialmente involucrados en la adquisición y/o utilización de hierro. Prácticamente todos los microorganismos requieren hierro (excepto algunos del género *Lactobacillus*) para sustentar distintos procesos vitales para la célula. El hierro es empleado como cofactor por muchas enzimas metabólicas y proteínas reguladoras. A pesar de ser uno de los elementos más abundantes en el ambiente, el hierro es un factor limitante para el

crecimiento bacteriano debido a que forma complejos insolubles en forma de hidróxido férrico bajo condiciones aerobias y pH neutro. Por ello, las bacterias han evolucionado hacia la síntesis de sistemas de transporte de alta afinidad para adquirir hierro (Venturi y col., 1995c). En los análisis de *microarrays* se detectaron genes como *pfri* y *pfra*, con mayor expresión en el fondo *cbrB*, que tiene relación con los sideróforos. *Pfri* es homólogo al factor sigma extracitoplasmático PvdS en *P. aeruginosa* (Cunliffe y col., 1995) y *Pfra* guarda homología con el factor anti- σ^{70} denominado AlgQ en *P. aeruginosa* y Rsd en *E.coli* (Jishage y Ishihama, 1999). En presencia de hierro, el represor Fur controla negativamente la expresión de genes de biosíntesis de sideróforos, mientras *Pfri* y *Pfra* se requieren para el proceso de biosíntesis en *Pseudomonas fluorescens* (Venturi y col., 1995a; Venturi y col., 1995b; Leoni y col., 2000). También se detectó mayor expresión del gen *hemO* (PP1005) en el mutante *cbrB*. En *P. aeruginosa* HemO es esencial para la asimilación de hierro a partir de grupos hemo mediante su rotura oxidativa (Ratliff y col., 2001). Sin embargo, la alteración de la expresión de estos genes en el mutante *cbrB* no permite explicar fácilmente su fenotipo de menor crecimiento en ausencia de hierro ya que estos genes están mejor expresados en el mutante. Si existe realmente relación entre la expresión de estos genes y el fenotipo de crecimiento sin hierro del mutante, habría que asumir que una sobreexpresión de alguno de estos genes produce un desequilibrio en algunos componentes de forma que no facilite una correcta captación del hierro. Además, la síntesis de pioverdina, pigmento fluorescente característico de las bacterias del género *Pseudomonas* no parece estar afectada por la mutación *cbrB*, ya que los mutantes *cbrB* producían un pigmento amarillo verdoso (extracelular) excitable a través de luz UV (figura 50B), como la estirpe silvestre. Este pigmento es además, el único producido por *P. putida* KT2440, ya que mutantes en la producción de pioverdina no son capaces de producir otro sideróforo (Matthijs y col., 2009).

Por otra parte, se detectó un gen activado por CbrB que codificaba una proteína de membrana externa que podría estar participando en el transporte de hierro a través del complejo Fe-sideróforo (PP3155, anexo, tabla S2), indicando que CbrB podría potenciar la capacidad para obtener hierro. La especificidad de la utilización de sideróforos reside principalmente en el receptor de membrana externa (Venturi y col., 1995c), de modo que la menor expresión de PP3155 en la estirpe mutante sería coherente con una asimilación menos eficiente del hierro por parte del mutante *cbrB* (MPO406).

Estos resultados sugieren que la producción de sideróforos y, consecuentemente, la capacidad para unir hierro, podría verse estimulada en el mutante *cbrB*. Sin embargo, la capacidad para transportar estos sideróforos acoplados a hierro (ferrosideróforos) al interior de la célula estaría impedida en un mutante *cbrB*. De esta forma el defecto de crecimiento observado en el mutante

cbrB en un medio limitado en hierro concuerda con el patrón de expresión del conjunto de genes relativos a la homeostasis del hierro que mostraron expresión alterada.

5.2.3. CbrB en el mapa regulador de *P. putida*

Además de los genes ya descritos, se detectaron una serie de genes que tenían asignada una función reguladora, y que estaban a su vez controlados por CbrB. Estos genes se agruparon en el **Grupo 5: Genes con función reguladora**, y comprende 16 genes. Todos ellos, excepto el gen PP1182, presentaron una expresión más alta en la estirpe silvestre y por lo tanto, estaban sujetos a un control positivo por CbrB. 12 de ellos codificaban proteínas reguladoras de respuesta y 4 codificaban proteínas sensoras (Anexo, tablas S3 y S4). Estos datos indican que CbrB podría controlar la expresión de otros reguladores provocando por tanto una cascada de regulación que permite ampliar y a su vez diversificar la señal.

Por último, se detectó un grupo de genes que no encajaron en las demás categorías y que se englobaron en el **grupo 6**. En este grupo se incluyeron genes relacionados con el transporte de moléculas de distinta naturaleza, distintos a los ya descritos para el metabolismo de aminoácidos y otros compuestos carbonados, que formaban un grupo extenso de transportadores genéricos y porinas (PP0268, PP1185, PP3754, PP3931, PP5207- PP5208). Por tanto, otro proceso que estaría regulado por CbrB en *P. putida* es el transporte de moléculas de diversa índole. Además de genes de transporte, este grupo comprende numerosos genes sin función asignada y anotados como codificantes de proteínas hipotéticas. Dos de estos genes de proteínas hipotéticas, PP1691 y PP1794, mostraron los mayores niveles de cambio de todos los genes con expresión diferencial, 8,6 veces más expresión un fondo *cbrB* frente a 8,3 veces más expresión en un fondo silvestre, respectivamente, lo que aumenta su atractivo para establecer su función en detalle en un futuro.

5.3. Estudio de la organización genómica y regulación del sistema CbrA-CbrB

Las pautas abiertas de lectura de *cbrA* y *cbrB* en *P. putida* se encuentran separadas por tan sólo 4 pb, lo que apuntaba a que se podrían transcribir como un operón. Para comprobar si ambos genes constituían una única unidad transcripcional se llevaron a cabo ensayos de *primer extension* para ambos genes. Sin embargo, la baja expresión de *cbrA* y *cbrB* en la estirpe silvestre, no permitió un mapeo del inicio de transcripción, lo cual es explicable debido a que son genes reguladores. Sin embargo, sí fue posible mapear el inicio en el mutante MPO406 debido a sus mayores niveles de transcrito de *cbrB*, así como desde un plásmido en la estirpe silvestre. El inicio de *cbrB* se mapeó dentro de la pauta abierta de lectura de *cbrA*, a 123 pb del codón de inicio de *cbrB*, confirmando que

cbrB posee su propio promotor y se transcribe de forma independiente de *cbrA*. La inspección de la secuencia aguas arriba del inicio de transcripción permitió identificar una secuencia consenso similar a la descrita para promotores dependientes del factor σ^{70} , lo que permite suponer que no requiere una proteína activadora. La cuantificación de la expresión de *cbrB* en la estirpe silvestre mediante RT-qPCR indicó que la expresión de *cbrB* no varió sustancialmente en los cuatro medios analizados (figura 22), aunque la expresión más baja resultó en L-aa. De forma similar, el posible efecto represor de CbrB sobre su propia expresión observado en el mutante de inserción no se reprodujo en el mutante de delección (Figura 56), lo que en conjunto nos permite decir que la expresión de CbrB es constitutiva. Sin embargo, en otras *Pseudomonas* se ha descrito que la expresión regulada de *cbrB*, mayor en medios con aminoácidos como fuente de carbono, frente a un medio mínimo con succinato o glucosa (Nishijyo y col., 2001; Zhang y Rainey, 2008).

5.4. Interacción del sistema CbrAB con el proceso de represión catabólica mediado por los RNAs pequeños CrcZ y CrcY

Durante el desarrollo de esta tesis, Sonnleitner y col. describieron la implicación del sistema Cbr en la regulación de la expresión del RNA pequeño CrcZ, involucrado en represión catabólica en *P. aeruginosa* (Sonnleitner y col., 2009; Abdou y col., 2011). CrcZ posee motivos en su secuencia que mimetizan los sitios de reconocimiento de la proteína represora de unión a RNA Crc, responsable de la represión catabólica en *P. putida* y *P. aeruginosa* (Ruiz-Manzano y col., 2005; Moreno y col., 2009a; Browne y col., 2010; Linares y col., 2010). De forma análoga a lo descrito en *P. aeruginosa*, en *P. putida* se detectaron niveles de expresión de *crcZ* mas elevados en condiciones libres de represión catabólica (medio con succinato como fuente de carbono) frente a una condición represora (medio LB). Estos datos son coherentes con los niveles de expresión de *crc* en los correspondientes medios, ya que son máximos en LB y en fase exponencial (Ruiz-Manzano y col., 2005). La expresión de *crcZ* resultó ser totalmente dependiente de CbrB y fue prácticamente indetectable en un mutante de delección $\Delta cbrB$ (MPO401).

Recientemente, se ha descrito en *P. putida* otro RNA pequeño también con función reguladora en el proceso de represión catabólica, denominado CrcY (Moreno y col., 2012). El gen *crcY* ha sido caracterizado en *P. putida*, y se encuentra localizado aguas abajo de *mvaB*, que codifica la hidroximetilglutaril-CoA liasa, enzima implicada en el catabolismo de valina y leucina. Estudios *in silico* han mostrado posibles homólogos de *crcY* en otras estirpes de *P. putida*, *P. entomophila*, *P. siringe* y *P. fluorescens* pero no en *P. aeruginosa* (Moreno y col., 2012). La caracterización de la expresión de *crcY* y su dependencia de CbrB mostró que también variaba en función del carácter represor de la fuente de carbono en la que se encontraba la bacteria, y se encontraba activada por

CbrB. Sin embargo, los niveles de expresión en un fondo *cbrB* (tanto en el mutante MPO401 como en MPO406), resultaron mantener un nivel basal más alto que en el caso de *crcZ*, lo que indicaba que parte de su transcripción no estaba activada por CbrB. Estudios en nuestro laboratorio han mostrado la existencia de una transcripción de *crcY* desde un promotor localizado aguas arriba de *mvaB* (García-Mauriño, enviado a publicar). Esta transcripción es independiente de CbrB, y proporciona los niveles de *crcY* que se habían detectado previamente mediante RT-PCR cuantitativa en un fondo *cbrB*. Queda aún por demostrar que la transcripción de *crcY* desde este promotor de *mvaB* conlleve un procesamiento y una producción de CrcY funcional.

El mapeo del extremo 5' de los transcritos de *crcZ* y *crcY* localizó el inicio de la transcripción a una distancia adecuada de una secuencia consenso de unión del factor de la RNA polimerasa para ambos transcritos. Además se detectaron secuencias consenso de unión de CbrB (TGTTAC-Nx-GTAACA) a unas 100- 150 pares de bases aguas arriba del inicio localizado. Cuando se realizó el mapeo en un fondo mutante *cbrB* (MPO401), la señal correspondiente a los transcritos de *crcZ* y *crcY* desde los promotores dependientes de σ^N fue indetectable, lo que de nuevo puso de manifiesto su estricta dependencia de CbrB.

La existencia de dos RNAs pequeños en *P. putida* capaces de secuestrar a la proteína Crc, podría explicar que un mutante *crcZ* no muestre un defecto en el crecimiento respecto a la estirpe silvestre. De hecho, Moreno y col. ya apuntaron que la delección individual de *crcZ* o *crcY* no producía ningún efecto en represión catabólica, pero el doble mutante *crcZcrcY* mostró represión catabólica constitutiva, que comprometió el crecimiento en algunas fuentes de carbono, como por ejemplo, citrato (Moreno y col., 2012). Los autores proponen que ambos RNAs actúan de forma conjunta titulando y modulando por tanto, los niveles de Crc en función de las condiciones metabólicas. El análisis de transcripción puso de manifiesto que la expresión estos dos pequeños RNAs es completamente dependiente de CbrB y que, por tanto, CbrB regula también el fenómeno de represión catabólica. Como ocurre con el mutante doble *crcZcrcY*, los mutantes *cbrB* estudiados en esta tesis tampoco podían utilizar citrato y es posible que alguno de los otros fenotipos observados en el mutante CbrB se deban realmente a la falta de los dos pequeños RNAs o, dicho de otra forma, a una represión catabólica en condiciones no represoras.

El análisis transcriptómico y proteómico realizado en un fondo *crc* (Moreno y col., 2009a) y su comparación con el análisis global ejercido por CbrB en este trabajo, parecen mostrar algunas coincidencias interesantes (ver tabla S5). Hay que tener en cuenta las limitaciones de las técnicas empleadas, y también que las condiciones experimentales en las que se han llevado a cabo tales ensayos no son idénticas. Sin embargo sí que se podría hacer una comparación de los genes dianas controladas por uno y otro sistema, para intentar establecer una jerarquía en el proceso de

regulación global en la bacteria. Aunque Crc no actúa a nivel transcripcional, sino como represor traduccional, se han detectado efectos sobre la expresión de algunos genes como consecuencia de esta represión. Presumiblemente esto puede deberse a que exista un control transcripcional ejercido por algún regulador transcripcional cuya traducción esté reprimida por Crc. Adicionalmente, el análisis proteómico complementario realizado por los autores avaló los datos obtenidos por transcriptómica, confirmando un control de las dianas identificadas (Moreno y col., 2009a). CbrB sin embargo actúa como activador transcripcional de algunos genes dependientes de σ^N , aunque el análisis transcriptómico reveló que puede ejercer un control, directo o indirecto, positivo o negativo, sobre un gran número de procesos celulares. La comparación de los dos estudios permitió identificar 26 genes sujetos al control de los dos sistemas Crc y Cbr (tabla S5). Como cabía esperar, 17 sufrían una regulación contraria por cada regulador: 16 eran activados por CbrB y reprimidos por Crc, mientras que sólo uno (PP2439, *ahpC*) estaba reprimido por CbrB y activado por Crc, lo que claramente concuerda con el hecho de que CbrB impida la represión catabólica ejercida por Crc. Por otra parte, dos genes (PP4737 y *aapJ*) estaban sujetos a un control positivo por parte de ambos sistemas, y 7 de ellos (*arcA*, *eda*, *rbsB*, *fruR* y PP4063-65) estaban reprimidos tanto por Crc como por CbrB. No tenemos una explicación obvia a esta regulación en el mismo sentido ejercida por estos dos reguladores, aunque los genes regulados están claramente implicados en el uso de fuentes de carbono ya que, de los reprimidos por ambos sistemas, 6 de ellos estaban relacionados con el metabolismo central o represión catabólica.

5.5. Análisis de la formación y dispersión de biofilms por la estirpe MPO406

En el desarrollo de esta tesis se ha descrito la robustez del fenotipo en formación y resistencia a la dispersión de biofilms mostrado por el mutante MPO406. Además, el análisis transcriptómico reveló una expresión diferencial en algunos genes relacionados con el proceso de formación/dispersión de biofilms. Aunque hemos comprobado que esta capacidad del mutante MPO406 no es debida a la carencia de CbrB, sino a un efecto de la inserción de un minitransposón en *cbrB*, consideramos interesante este fenotipo por su potencial biotecnológico, y procedimos a su caracterización.

En *P. aeruginosa*, se ha descrito que la formación y mantenimiento de los biofilms implica la intervención de algunos componentes extracelulares como proteínas adhesinas, apéndices proteicos, exopolisacáridos y DNA extracelular (Pamp y Tolker-Nielsen, 2007). En esta línea, los análisis transcriptómicos revelaron una mayor expresión en el mutante MPO406 de algunos genes cuyos productos podrían participar en el proceso de formación de biofilms (Anexo, tabla S4). Algunos de estos eran genes que codificaban proteínas de transporte de exopolisacáridos (PP3126 y PP3128),

otras con dominios reguladores GGDEF (PP1155 y PP3932) o la proteína LapF (*codificada por PP0806*). LapF es una adhesina, miembro de una familia de grandes proteínas ubíquas de unión a superficies que contienen motivos repetidos, que se ha visto que participan en la adhesión célula-superficie, célula-célula y también en la adhesión a raíces de plantas (Lasa y Penades, 2006; Yousef y Espinosa-Urgel, 2007; Martínez-Gil y col., 2010).

Los tratamientos con distintos agentes enzimáticos mostraron que el biofilm del mutante MPO406 mostraba una alta resistencia al tratamiento con proteinasa K, así como una mayor sensibilidad al tratamiento con metaperyodato, que actúa sobre los enlaces C-C de los polisacáridos. Estos datos sugieren una composición de la matriz que forma el biofilm del mutante MPO406 rica en polisacáridos, y en esta línea se ha descrito que los exopolímeros de tipo celulosa parecen jugar un papel importante en la formación de biofilms en distintas especies (Amikam y Benziman, 1989; Wong y col., 1990; Zogaj y col., 2001; Spiers y col., 2003).

Por otra parte, se ha descrito que, en *Salmonella* y *E. coli*, la resistencia a polimixinas, grupo de antimicrobianos al que pertenece la colistina, implica dos sistemas de dos componentes, PmrAB y PhoPQ, donde la expresión del primero es inducida por el segundo, que responde a limitación de Mg^{2+} (Gunn y Miller, 1996; Soncini y Groisman, 1996). El mecanismo de resistencia consiste en la síntesis de N_4 -aminoarabinosa, activada por el sistema PmrAB, que se une al lípido A de la membrana y reduce la unión de las polimixinas, haciendo a las células resistentes al péptido (Trent y col., 2001). *P. putida* no parece poseer ortólogos a estos genes reguladores en su genoma, pero sí numerosos transportadores y porinas con expresión diferencial, que podrían conllevar que la permeabilidad ante distintos compuestos puede ser distinta en el mutante y el silvestre. En este sentido, una composición distinta de la membrana, o una permeabilidad alterada podrían provocar los fenotipos observados, tanto en respuesta a colistina, como en respuesta a SDS.

Adicionalmente, los resultados obtenidos del tratamiento de biofilms tempranos con altas concentraciones de SDS en cámaras de flujo también apoyan la hipótesis de una matriz extracelular distinta para las estirpes silvestre y mutante, ya que los biofilms formados por MPO406 son más cohesivos que los de la estirpe silvestre, aún estando ambos en estado de microcolonia. Sin embargo, el efecto del SDS sobre biofilms maduros (72 horas) de ambas estirpes fue diferente, puesto que se observaron efectos distintos a baja o alta concentración de SDS. Como se detalló en el capítulo 4.4, a baja concentración de SDS se observó un biofilm inerte en el mutante con una fina capa superior de células vivas, aunque estructuralmente intacto frente a un biofilm silvestre vivo. Esta distribución celular de células vivas y muertas ha sido descrito en *P. aeruginosa* (Haagensen y col., 2007). Sin embargo, al aumentar 10 veces la concentración del químico, la estirpe silvestre dispersó el biofilm, mientras el mutante produjo un biofilm mixto de células vivas y muertas. Estos datos sugieren que al

aumentar la concentración de SDS hasta 0,1 % podría desencadenarse una respuesta a estrés en el mutante MPO406 que sería la responsable de tal resistencia. Tal resistencia podría explicarse por una modificación de la composición de membrana, o a nivel de composición de la matriz extracelular. En este último caso, una matriz representada no sólo por proteínas sino también por exopolisacáridos podría explicar una cierta resistencia a disolución, como indicaban los ensayos de tratamiento enzimático de películas.

Cuando se analizó la capacidad de dispersión de la estirpe MPO406, tanto en placas multipocillo como por ensayos en cámara de flujo, se observó una resistencia a la dispersión del biofilm cuando el medio estaba agotado en nutrientes, se interrumpía su suministro o se suministraba SDS o colistina. Este fenómeno resulta muy interesante pues la caracterización de la composición de su biofilm podría contribuir al diseño de tratamientos para combatir infecciones multiresistentes en especies patógenas como *P. aeruginosa*. La dispersión de un biofilm en *P. putida* y *P. fluorescens* responde a un proceso de señalización celular que implica la participación de moléculas señal como el c-di-GMP y la intervención de adhesinas como las proteínas Lap (Newell y col., 2009; Gjermansen y col., 2010; Navarro y col., 2011; Newell y col., 2011). Según los autores, cuando el fosfato se encuentra limitante en la célula se reducen los niveles de c-di-GMP, y la proteína receptora de esta señal, LapD, se inactiva. Esto permite que la proteasa periplásmica, LapG proteolice el dominio N-terminal de LapA que la ancla a la membrana externa, liberándola de la superficie de la célula y provocando la dispersión del biofilm. En condiciones de exceso de fosfato, LapD se une al c-di-GMP en el citoplasma, y secuestra a LapG en el periplasma, promoviendo la adhesión celular gracias al mantenimiento de LapA en la superficie de la célula (Newell y col., 2011). El análisis de los genes potencialmente involucrados en el proceso de biofilms con expresión diferencial por transcriptómica puso de manifiesto que PP3126 y PP3128 (implicados en síntesis y transporte de polisacáridos), y la proteína con dominio GGDEF PP3932 tenían una expresión diferencial en las estirpes silvestre y mutantes *cbrB* (figura 51). Sin embargo, *lapF* (PP0806) sólo mostró mayores niveles de expresión en el mutante MPO406 respecto a la estirpe silvestre, y no en el mutante MPO401. En este sentido, LapF podría ser un elemento responsable del fenotipo del mutante MPO406 en formación y resistencia a dispersión. Martínez-Gil y col. (2010) han descrito que LapF proteína es la segunda proteína en tamaño en *P. putida*, que se localiza en la superficie celular. Aunque las estirpes silvestre y mutante no difieren en las etapas iniciales de formación de biofilms, la formación de microcolonias y su posterior maduración sí parece verse afectada por la mutación *lapF*. Los autores sugieren un papel de LapF en el establecimiento de interacciones célula-célula, localizándose en las regiones internas de las microcolonias formadas por *P. putida*. Además, su expresión es dependiente del factor σ de fase estacionaria RpoS, indicando que la proteína LapF podría ejercer su función en

etapas tardías de la formación de biofilms (Martínez-Gil y col., 2010). Sin embargo, se desconoce si esta adhesina responde al mismo sistema de señalización por c-di-GMP que LapA. Una expresión incrementada de este gen podría provocar una mayor exposición de esta proteína en la superficie celular, lo que podría aumentar la cohesividad del biofilm.

Otro fenómeno de interés detectado fue la capacidad de la estirpe MPO406 para desplazar a la estirpe silvestre en la colonización de la superficie en ensayos de flujo continuo, incluso cuando la inoculación de la estirpe MPO406 se realizaba una vez formado el biofilm de la estirpe silvestre. La naturaleza de este fenómeno no está clara pero es posible que la estirpe MPO406 pueda estar produciendo alguna molécula o metabolito que provoque la dispersión del silvestre, ya que se observaba la eliminación del silvestre sin que el crecimiento del mutante hubiese aun alcanzado la zona que había sido abandonada por el silvestre. En otras palabras, que el mutante era capaz de inducir al dispersión del silvestre a distancia. En *P. aeruginosa* se ha descrito que una estirpe hipermutadora, deficiente en el sistema de reparación de bases apareadas de forma incorrecta, desplaza a la estirpe silvestre en cultivo mixto en biofilms. Sin embargo, debido a su capacidad de hipermutabilidad, estas estirpes se encuentran adaptadas al crecimiento en biofilm, por lo que esta mayor capacidad de generar estas variantes adaptadas es lo que le brindaría la mayor competitividad a la cepa hipermutadora (Lujan y col., 2011) Existen referencias en la bibliografía de moléculas que provocan la dispersión de biofilms, como puede ser el propio c-di-GMP (Mills y col., 2011), aunque es poco probable que sea el caso ya que puesto que es una molécula intracelular. En *P. aeruginosa* se ha descrito la implicación de un ácido graso como mensajero en la señalización del proceso de dispersión de biofilms (Davies y Marques, 2009), o de otra molécula distinta producida también por *P. aeruginosa* que dispersa un biofilm del patógeno de plantas *Agrobacterium tumefaciens* (Hibbing y Fuqua, 2012). La identificación de esta molécula producida por el mutante MPO406 podría tener interesantes aplicaciones médicas o biotecnológicas para eliminar biofilms de *P. putida* o incluso de otras *Pseudomonas* patógenas que deben sus mecanismos de multirresistencia a la formación de biofilms.

Con el objeto de identificar la causa se intentó reproducir el efecto causado por la inserción en el mutante de delección MPO401. Puesto que el fenotipo de la superformación y no dispersión de biofilms por parte de la estirpe MPO406 estaba claramente ligado a la inserción del miniTn5 y no a mutaciones adicionales en otra zona cromosómica, con objeto de identificar la causa del fenotipo, que es distinta a la falta de CbrB, se intentaron reproducir algunas de las características peculiares del mutante MPO406 en el mutante de delección MPO401. Estas fueron unos niveles elevados del RNA pequeño CrcZ, así como la presencia de un péptido truncado de aproximadamente 37 KDa, que probablemente correspondía al extremo amino terminal de CbrB, ya que era detectado con

anticuerpos anti-CbrB. Los altos niveles del transcrito que contenía *crcZ* correlacionaban con aquellos del extremo 3' del gen *cbrB* (aguas abajo de la inserción del transposón) obtenidos por RT-qPCR, indicando que la transcripción podría venir desde alguna región promotora contenida en el transposón.

Sea cual sea el mecanismo regulador subyacente, no es probable que los niveles de *crcZ* sean un elemento *per se* implicado en la formación de biofilms, puesto que los mutantes *crc* y *crcZ* de *P. putida* no tienen efectos en formación o dispersión de biofilms (datos no mostrados). Como era previsible, al aumentar mediante expresión heteróloga los niveles de *crcZ* desde un promotor fuerte como *P_{tac}* en un fondo silvestre o en la estirpe MPO401, no se observó una variación evidente en la formación o dispersión de biofilms.

Por otra parte, la implicación del dominio REC de CbrB al menos en el proceso de dispersión de biofilms podría significar su comunicación con proteínas sensoras. Una posible hipótesis es que el péptido truncado, que contiene el dominio REC del elemento regulador, pueda detectar la señal inductora del sistema de fosforilación, y que su superproducción pudiera interferir con CbrA u otras proteínas quinasas, alterando el funcionamiento de otros sistemas de dos componentes. El suministro *en trans* de una versión truncada del extremo N-terminal de CbrB que contiene el dominio REC del elemento regulador no provocó ningún efecto significativo sobre la dinámica de formación y dispersión de biofilms del mutante MPO401. Por el contrario, sí que provocó una resistencia a la dispersión en la estirpe silvestre. Sin embargo, no se observó un aumento en la cantidad de biofilm formado ni una mejor agregación de las células en cultivo. En definitiva, se ha podido reproducir parcialmente el fenotipo del mutante de inserción pero no al completo. Quizás, para observar un fenotipo completo sobre la formación de biofilms sea necesaria la presencia simultánea de altos niveles de CrcZ y la presencia de la forma truncada de CbrB.

Como conclusión general, nuestros resultados son coherentes con el papel descrito para CbrB en el catabolismo de compuestos nitrogenados, sin embargo, en *P. putida* la identificación de otras múltiples funciones no relacionadas con el metabolismo del carbono sujetas a regulación de forma dependiente de CbrB indica que CbrB tiene una función celular mucho más amplia que la descrita inicialmente. Algunas de estas funciones podrían estar relacionadas con la adaptación óptima a la limitación de carbono y podría ser regulada por la misma señal ambiental (limitación de carbono) a través de CbrB. Bajo esta condición, CbrB reprogramaría el metabolismo del carbono de la célula, promoviendo la movilidad o quimiotaxis, hacia zonas con mayor concentración de nutrientes. Además, la expresión alterada de otros genes implicados en otras respuestas a estrés y los fenotipos adicionales en el mutante *cbrB* indican que la función del sistema Cbr podría ir incluso más allá del

control de distintas respuestas a limitación de nutrientes, como se propone en el modelo de la figura 70.

Proponemos que CbrB es un elemento con una localización alta en la jerarquía de la regulación global, que controla, directa o indirectamente, multitud de procesos que pueden ser importantes para un rendimiento óptimo de las bacterias en un ambiente en continuo cambio. Uno de tales procesos sería la respuesta de la bacteria a la presencia de diversas fuentes de carbono por las que muestra distinta preferencia, vía represión catabólica que constituye en sí misma una regulación de carácter global. Esta visión se apoya en el gran número de genes con expresión alterada y fenotipos en el mutante *cbrB*, que podrían implicar el control de determinados conjuntos de genes.

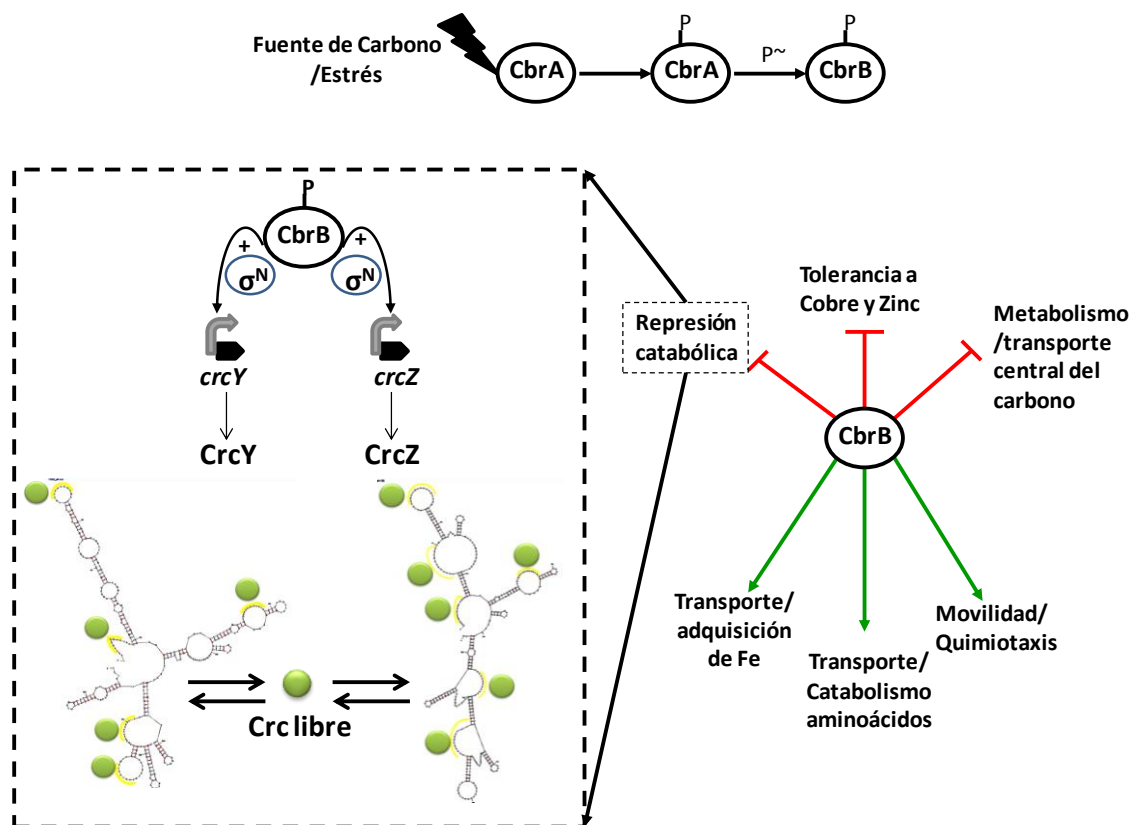


Figura 70. Modelo de regulación global por CbrAB en *P. putida*. Se muestra el modelo propuesto de regulación ejercida por el sistema CbrAB en *P. putida*, con los procesos que se encontrarían reprimidos en rojo y aquellos activados en verde. Se muestra la cascada de fosforilación, que se inicia con la autofosforilación de CbrA ante la recepción de la señal adecuada; CbrA transmite el grupo fosfato a CbrB, que adquiere su forma activa. Enmarcado por línea discontinua se detalla la activación de CbrB de los pequeños RNAs CrcZ y CrcY, y donde Crc se representa en círculos verdes; σ^N denota el factor alternativo σ^N , necesario para la activación de la transcripción de *crcZ* y *crcY*.

6. CONCLUSIONES

1. El regulador de respuesta CbrB es esencial para la asimilación o transporte de histidina, arginina, ornitina, prolina y citrato como fuentes de carbono, así como para la utilización de tirosina como fuente de carbono y nitrógeno en *P. putida*.
2. El regulador NtrC participa en la utilización de ornitina y tirosina como fuente de nitrógeno, y ejerce un papel accesorio en el transporte/utilización de prolina como fuente de carbono. Asimismo, parece actuar de forma coordinada con CbrB en la asimilación de tirosina e histidina como fuente de carbono.
3. El defecto en crecimiento del mutante *cbrB* a expensas de citrato, así como el grupo de genes con expresión diferencial relativos al metabolismo central del carbono, indica que CbrB participa también en la regulación de fuentes de carbono no nitrogenadas en *P. putida*.
4. Los datos de transcriptómica revelaron que CbrB controla un gran número de genes relacionados con el transporte de distintas moléculas, postulándose así como un importante elemento regulador del tránsito de moléculas a través de la membrana celular en *P. putida*.
5. CbrB participa en la respuesta reguladora del movimiento de *swimming* y *swarming* en *P. putida*, posiblemente dirigido a potenciar la capacidad de la bacteria para buscar aquellos ambientes más favorables para su crecimiento.
6. El sistema CbrAB participa en la homeostasis de metales pesados y parece potenciar el transporte de hierro al interior celular.
7. El gen *cbrB* se transcribe independientemente de *cbrA*, pese a la separación de tan sólo 4 pb entre ellos, desde un promotor constitutivo localizado dentro de *cbrA*.
8. CbrB activa la expresión de los pequeños RNAs CrcZ y CrcY, de forma dependiente de σ^N , modulando la cantidad de Crc libre en la célula y, por tanto, el nivel de represión catabólica de *P. putida*.
9. El fenotipo de elevada producción de biofilms no dispersables del mutante de inserción en *cbrB*, MPO406, no se debe a la falta de CbrB. Este mutante presenta niveles muy altos de CrcZ y de un péptido que contiene el extremo amino terminal (REC) de CbrB. La matriz extracelular del mutante MPO406 presenta una composición rica en exopolisacáridos y alto contenido proteico .

10. El sistema CbrAB de *P. putida* parece operar sobre múltiples procesos celulares, además de los ya descritos para otras *Pseudomonas* relativos al transporte/metabolismo de compuestos carbonados, lo que lo sitúa muy alto en la jerarquía reguladora de *P. putida*. Todas estas funciones podrían ir dirigidas a conseguir una óptima adaptación a condiciones de limitación de carbono o diversas formas de estrés, promoviendo la movilidad y quimiotaxis hacia nichos con mayor disponibilidad de nutrientes o condiciones menos adversas, generando así una respuesta integrada a la condición ambiental existente.

7. ANEXO

Tabla S1. Genes con expresión diferencial en *P. putida* KT2442 vs. mutante *cbrB* (MPO406) en L-aminoácidos. Los valores positivos indican mayor expresión en la estirpe silvestre, mientras valores negativos se refieren a una mayor expresión en el mutante *cbrB* (MPO406).

Descripción	Señal promedio	Veces de cambio	p-value
PP0012 <i>recF</i> -DNA replication and repair protein RecF	476	-1,9	0,001
PP0268 <i>oprQ</i> -outer membrane protein OprE3	1974	1,9	0,000
PP0320 -methyl-accepting chemotaxis transducer	353	-2,5	0,004
PP0537 -transcriptional regulator putative	655	-1,9	0,003
PP0750 -conserved hypothetical protein	1062	1,9	0,000
PP0806 -surface adhesion protein putative	317	-2,4	0,003
PP0883 -porin putative	258	2,4	0,028
PP0915 <i>sodB</i> -superoxide dismutase (Fe)	1264	1,9	0,013
PP1001 <i>arcA</i> -arginine deiminase	2218	-3,1	0,000
PP1002 <i>arcD</i> -arginine/ornithine antiporter	961	-2,2	0,005
PP1005 hemO-heme oxygenase	154	-2,6	0,023
PP1024 <i>eda</i> -2-dehydro-3-deoxyphosphogluconate aldolase/4-hydroxy-	636	-1,9	0,008
PP1036 -periplasmic binding domain/transglycosylase SLT domai	250	-2,3	0,048
PP1059 -amino acid permease	342	2,1	0,003
PP1068 -amino acid ABC transporter ATP-binding protein	419	2,3	0,002
PP1083 -bacterioferritin-associated ferredoxin putative	434	-1,8	0,012
PP1138 <i>braF</i> -branched-chain amino acid ABC transporter ATP-bindin	627	1,8	0,002
PP1141 <i>braC</i> -branched-chain amino acid ABC transporter periplasmi	1601	1,8	0,002
PP1178 -hypothetical protein	638	-3,2	0,000
PP1185 <i>oprH</i> -outer membrane protein H1	10207	2,1	0,009
PP1209 -cold-shock domain family protein	4616	1,9	0,007
PP1297 <i>aapJ</i> -general amino acid ABC transporter periplasmic bindi	151	1,9	0,020
PP1347 -glutathione S-transferase family protein	867	1,8	0,000
PP1348 -MutT/nudix family protein/thiamine-phosphate pyrophos	559	2,2	0,000
PP1360 <i>groES</i> -chaperonin 10 kDa	4176	2,0	0,001
PP1361 <i>groEL</i> -chaperonin 60 kDa	4066	2	0,000
PP1582 -hypothetical protein	141	-1,8	0,045
PP1690 -conserved hypothetical protein	149	-2,3	0,003
PP1691 -conserved hypothetical protein	327	-8,6	0,010
PP1742 -conserved hypothetical protein	212	-3,9	0,000
PP1912 <i>plsX</i> -fatty acid/phospholipid synthesis protein PlsX	2280	-1,9	0,000
PP1962 -site-specific recombinase phage integrase family	596	1,9	0,010
PP1972 <i>tyrB-1</i> -aromatic-amino-acid aminotransferase	2751	1,9	0,000
PP2251 -conserved hypothetical protein	329	-1,8	0,036
PP2273 -DNA polymerase	71	-2,3	0,041
PP2296 -hypothetical protein	1685	-2,3	0,000
PP2297 -integrative genetic elementPPu40 integrase	533	-2,3	0,002
PP2366 -antibiotic MFS transporter putative	45	-2,1	0,026
PP2432 -oxygen-insensitive NAD(P)H nitroreductase	339	1,9	0,001
PP2465 <i>thrS</i> -threonyl-tRNA synthetase	1487	-2	0,046
PP2856 -conserved hypothetical protein	157	-2,1	0,010

PP2874 -hypothetical protein	383	-1,9	0,004
PP2928 -conserved hypothetical protein	1619	1,9	0,000
PP3027 -conserved hypothetical protein	85	-1,8	0,045
PP3089 -conserved hypothetical protein	3035	2,3	0,000
PP3122 -CoA-transferase subunit A putative	219	2,4	0,000
PP3126 -polysaccharide export protein putative	67	-2,8	0,010
PP3128 -exopolysaccharide biosynthesis/transport protein put	72	-2	0,049
PP3163 <i>benC</i> -benzoate dioxygenase ferredoxin reductase component	44	1,9	0,030
PP3179 -transcriptional regulator LysR family	271	-1,8	0,032
PP3365 -acetolactate synthase catabolic putative	3215	1,8	0,000
PP3412 -DNA-binding response regulator LuxR family	73	-1,9	0,044
PP3704 -hypothetical protein	1584	-1,9	0,000
PP3710 -hypothetical protein	263	2	0,001
PP3764 -porin putative	341	-1,8	0,000
PP3840 -hypothetical protein	1614	-1,9	0,000
PP3878 -phage minor capsid protein C putative	134	1,9	0,019
PP3901 -conserved hypothetical protein	289	1,8	0,001
PP3909 -hypothetical protein	698	2,0	0,002
PP4012 -isocitrate dehydrogenase NADP-dependent monomeric-t	2086	1,9	0,000
PP4013 -MutT/nudix family protein	325	2,3	0,000
PP4070 -hypothetical protein	371	-2,1	0,000
PP4118 -membrane protein putative	101	-2,2	0,037
PP4178 -dienelactone hydrolase family protein	479	2	0,000
PP4201 -electron transfer flavoprotein alpha subunit	1230	1,9	0,013
PP4202 -electron transfer flavoprotein beta subunit	3482	2	0,048
PP4252 <i>ccoQ-1</i> -cytochrome c oxidase cbb3-type CcoQ subunit	3172	-2,3	0,000
PP4253 <i>ccoP-1</i> -cytochrome c oxidase cbb3-type subunit III	1601	-2,2	0,000
PP4261 -cation-transporting P-type ATPase	503	-2,0	0,000
PP4377 -flagellin FlaG putative	701	1,8	0,007
PP4378 <i>fliC</i> -flagellin FliC	6250	2,3	0,000
PP4403 bkdB-2-oxoisovalerate dehydrogenase lipoamide acyltransfe	901	2,1	0,000
PP4493 -oxidoreductase putative	1396	2,0	0,002
PP4619 -maleylacetoacetate isomerase putative	669	1,9	0,002
PP4693 -C4-type zinc finger protein DksA/TraR family	2015	2,0	0,003
PP4696 -nitrogen regulation protein NR(I)	472	-1,9	0,001
PP4727 <i>dnaK</i> -dnaK protein	2081	2,0	0,005
PP4728 <i>grpE</i> -heat shock protein GrpE	1082	2,2	0,000
PP4981 -conserved hypothetical protein	791	2,0	0,012
PP5000 <i>hslV</i> -heat shock protein HslV	460	1,8	0,036
PP5001 <i>hslU</i> -heat shock protein HslVU ATPase subunit HslU	687	1,8	0,002
PP5029 <i>hutG</i> -formiminoglutamase	302	2,7	0,000
PP5032 <i>hutH</i> -histidine ammonia-lyase	390	1,8	0,002
PP5033 <i>hutU</i> -urocanate hydratase	1393	2,1	0,000
PP5086 -thermonuclease family protein	211	1,9	0,005
PP5193 <i>gcvH-2</i> -glycine cleavage system H protein	269	1,8	0,003
PP5203 -5-formyltetrahydrofolate cyclo-ligase family protein	2168	-1,8	0,000

PP5232 -conserved hypothetical protein	6331	2,6	0,000
PP5338 <i>aspA</i> -aspartate ammonia-lyase	4572	2,0	0,000
PP5346 <i>oadA</i> -oxaloacetate decarboxylase alpha subunit	534	2	0,013
PP5375 -transcriptional regulator LysR family	351	-2,2	0,011

Tabla S2. Genes con expresión diferencial en el mutante *ntrC* (MPO201) vs. mutante *cbrB ntrC* (MPO400). Los valores positivos indican mayor expresión en el mutante *ntrC*, mientras valores negativos se refieren a una mayor expresión en el mutante *cbrB ntrC* (MPO400).

Descripción	Señal promedio	Veces de cambio ^a	p-value
PP0137 <i>gltP</i> -proton/sodium-glutamate/aspartate symporter	515	2,2	0,001
PP0191 <i>pfrA</i> -transcriptional regulator PfrA	878	-2,1	0,000
PP0266 -conserved hypothetical protein	197	-1,9	0,046
PP0268 <i>oprQ</i> -outer membrane protein OprE3	1264	2,4	0,000
PP0354 -CBS domain protein	115	-2,2	0,004
PP0542 -ethanolamine ammonia-lyase light subunit putative	13	1,9	0,049
PP0638 -ISPpu15 transposase Orf1	467	1,8	0,000
PP0750 -conserved hypothetical protein	911	1,8	0,000
PP0792 <i>fruR</i> - fructose transport system repressor FruR	158	-1,9	0,003
PP0806 <i>lapF</i> - surface adhesion protein putative	61	-1,9	0,006
PP0864 -ornithine decarboxylase putative	1280	1,9	0,000
PP0915 <i>sodB</i> -superoxide dismutase (Fe)	1220	2,0	0,001
PP0998 -conserved hypothetical protein	157	-1,8	0,016
PP1001 <i>arcA</i> -arginine deiminase	1166	-2,7	0,003
PP1002 <i>arcD</i> -arginine/ornithine antiporter	367	-4,0	0,004
PP1022 <i>zwf</i> -1-glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	587	-2,5	0,005
PP1023 <i>pgl</i> -6-phosphogluconolactonase	70	-2,0	0,034
PP1024 <i>eda</i> -2-dehydro-3-deoxyphosphogluconate aldolase/4-hydroxy-	436	-2,0	0,005
PP1069 -amino acid ABC transporter permease protein	196	1,9	0,000
PP1070 -amino acid ABC transporter permease protein	234	1,8	0,006
PP1138 <i>braF</i> -branched-chain amino acid ABC transporter ATP-bindin	323	1,9	0,000
PP1155 -YaiC/YhcK/ArdA family protein, diguanylate cyclase	107	-2,3	0,045
PP1157 -acetolactate synthase catabolic putative	3557	1,9	0,000
PP1169 <i>dctP</i> -TRAP dicarboxylate transporter DctP subunit	99	-2,1	0,020
PP1182 -sensor histidine kinase	530	1,8	0,000
PP1291 -PhoH family protein	407	-2,2	0,009
PP1347 -glutathione S-transferase family protein	555	2,3	0,000
PP1348 -MutT/nudix family protein/thiamine-phosphate pyrophosphate	213	2,1	0,000
PP1371 -methyl-accepting chemotaxis transducer	155	2,1	0,004
PP1594 <i>frr</i> -ribosome recycling factor	626	1,8	0,004
PP1691 -conserved hypothetical protein	115	-2,8	0,000
PP1729 -hypothetical protein	650	-2,2	0,027
PP1742 -conserved hypothetical protein	150	-2,4	0,011
PP1743 -sodium:solute symporter family protein	37	-2,6	0,036
PP1768 <i>serC</i> -3-phosphoserine aminotransferase	660	2,0	0,001
PP1794 -hypothetical protein	16549	8,3	0,000

PP1797 -HlyD family secretion protein	183	2,6	0,000
PP1815 <i>pyrF</i> -orotidine 5-phosphate decarboxylase	414	1,8	0,000
PP1905 <i>rne</i> -ribonuclease E	318	1,8	0,000
PP1972 <i>tyrB</i> -1-aromatic-amino-acid aminotransferase	2646	1,9	0,000
PP2161 -conserved hypothetical protein	745	-1,8	0,001
PP2180 -aminotransferase class III	60	1,8	0,011
PP2206 -peptidase U32 family	1494	1,9	0,001
PP2220 -C4-type zinc finger protein DksA/TraR family	1035	1,9	0,000
PP2251 -conserved hypothetical protein	166	-1,8	0,031
PP2292 -hypothetical protein	223	-1,8	0,038
PP2432 -oxygen-insensitive NAD(P)H nitroreductase	181	1,8	0,001
PP2439 <i>ahpC</i> -alkyl hydroperoxide reductase C subunit	172	1,9	0,001
PP2453 <i>ansA</i> -L-asparaginase II	251	2,4	0,000
PP2454 <i>rbsB</i> -ribose ABC transporter periplasmic ribose-binding protein	63	-1,9	0,001
PP2512 <i>folE</i> -2-GTP cyclohydrolase I	166	-1,9	0,009
PP2853 -conserved hypothetical protein	40	-2,2	0,008
PP2856 -conserved hypothetical protein	95	-2,5	0,003
PP2928 -conserved hypothetical protein	1302	2,1	0,000
PP3128 -exopolysaccharide biosynthesis/transport protein put	61	-2,0	0,029
PP3131 -hypothetical protein	25	-2,6	0,016
PP3155 -outer membrane ferric siderophore receptor putative	437	2,0	0,040
PP3179 -transcriptional regulator LysR family	177	-2,1	0,002
PP3306 -hypothetical protein	27	-1,8	0,035
PP3317 -hypothetical protein	140	-2,2	0,016
PP3365 -acetolactate synthase catabolic putative	5024	2,0	0,000
PP3439 -transcriptional regulator AraC family	87	-2,1	0,040
PP3533 -ornithine cyclodeaminase	110	-5,3	0,001
PP3699 -hypothetical protein	412	1,8	0,001
PP3704 -hypothetical protein	805	-1,8	0,003
PP3710 -hypothetical protein	137	2,9	0,002
PP3745 <i>glcD</i> -glycolate oxidase subunit GlcD	47	-1,8	0,025
PP3764 -porin putative	148	-1,9	0,000
PP3835 -sensory box histidine kinase	567	-1,9	0,013
PP3840 -hypothetical protein	891	-1,9	0,008
PP3931 -transporter sodium/sulfate symporter family	207	-2,5	0,011
PP3932 -GGDEF domain protein	134	-1,9	0,011
PP4013 -MutT/nudix family protein	551	2,7	0,000
PP4063 -long-chain-fatty-acid-CoA ligase putative	480	-1,9	0,000
PP4064 <i>ivd</i> -isovaleryl-CoA dehydrogenase	1010	-2,4	0,000
PP4065 -3-methylcrotonyl-CoA carboxylase beta subunit putative	309	-3,0	0,008
PP4103 -low-affinity inorganic phosphate transporter	578	-1,8	0,004
PP4115 -conserved hypothetical protein	1300	-1,9	0,000
PP4116 <i>aceA</i> -isocitrate lyase	393	-1,8	0,002
PP4178 -dienelactone hydrolase family protein	603	1,9	0,001
PP4244 <i>pfrI</i> -ferric regulator PfrI	243	-1,9	0,013
PP4261 -cation-transporting P-type ATPase	646	-1,8	0,012

PP4333 -CheW domain protein	597	-1,8	0,000
PP4334 -ParA family protein	312	-1,8	0,002
PP4377 -flagellin FlaG putative	1027	2,1	0,038
PP4378 <i>fliC</i> -flagellin FliC	4690	2,0	0,000
PP4383 <i>flgI</i> -flagellar P-ring protein precursor FlgI	273	-1,8	0,004
PP4487 <i>acsA</i> -acetyl-coA synthetase	898	-1,9	0,026
PP4547 -glutamine synthetase putative	451	-2,8	0,000
PP4569 -hypothetical protein	1048	-2,1	0,000
PP4578 -major facilitator family transporter	185	1,8	0,001
PP4619 -maleylacetoacetate isomerase putative	507	1,9	0,000
PP4624 -hydrolase alpha/beta fold family	341	-2,2	0,005
PP4696 <i>cbrB</i> -nitrogen regulation protein NR(I)	430	-3,3	0,000
PP4724 <i>carA</i> -carbamoyl-phosphate synthase small subunit	2910	1,8	0,000
PP4728 <i>grpE</i> -heat shock protein GrpE	912	1,9	0,003
PP4737 -D-lactate dehydrogenase putative	298	2,1	0,000
PP4781 -sensor histidine kinase	850	-2,2	0,000
PP4787 -PhoH family protein	1730	-1,8	0,000
PP4788 -conserved hypothetical protein TIGR00043	2441	-1,8	0,000
PP4822 <i>purH</i> -phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase	2307	1,8	0,000
PP5029 <i>hutG</i> -formiminoglutamase	366	3,3	0,000
PP5030 <i>hutI</i> -imidazolonepropionase	147	1,9	0,019
PP5086 -thermonuclease family protein	253	2,2	0,001
PP5092 -NLP/P60 family protein	143	-2,6	0,001
PP5117 -hydrolase alpha/beta fold family	342	-1,8	0,007
PP5151 -conserved hypothetical protein	33	-1,8	0,010
PP5165 -lipoprotein putative	348	2,5	0,001
PP5206 -membrane fusion protein	1343	-1,8	0,003
PP5207 -ABC transporter ATP-binding protein/permease protein	394	-2,1	0,002
PP5208 -ABC transporter permease protein	291	-1,9	0,010
PP5232 -conserved hypothetical protein	7559	1,8	0,001
PP5322 -metal ion transporter putative	809	-2,7	0,026
PP5335 <i>purK</i> -phosphoribosylaminoimidazole carboxylase ATPase subunit	1331	1,8	0,000
PP5338 <i>aspA</i> -aspartate ammonia-lyase	6972	2,6	0,007
PP5350 -transcriptional regulator RpiR family	1612	-1,8	0,002
PP5365 -cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase putative	156	-2,5	0,001
PP5375 -transcriptional regulator LysR family	275	-2,5	0,000
PP5383 <i>copR</i> -transcriptional activator CopR	126	-1,9	0,000
PP5384 <i>copS</i> - sensor protein CopS	86	-2,0	0,001
PP5390 -hypothetical protein	1321	-1,8	0,001
PP5391 -hypothetical protein	1519	-1,9	0,000

Tabla S3. Intersección de los genes con expresión diferencial en los dos análisis por *microarrays* realizados en esta tesis. En rojo se muestran los genes más expresados en un fondo *cbrB*⁻ y en verde se muestran aquéllos más expresados un fondo *cbrB*⁺

Descripción	Veces de cambio	
	wt/ <i>cbrB</i>	<i>ntrC</i> / <i>cbrBntrC</i>
PP0268 <i>oprQ</i> -outer membrane protein OprE3	1,9	2,4
PP0750 -conserved hypothetical protein	1,9	1,8
PP0806 -surface adhesion protein putative	-2,4	-1,9
PP0915 <i>sodB</i> -superoxide dismutase (Fe)	1,9	2
PP1001 <i>arcA</i> -arginine deiminase	-3,1	-2,7
PP1002 <i>arcD</i> -arginine/ornithine antiporter	-2,2	-4
PP1024 <i>eda</i> -2-dehydro-3-deoxyphosphogluconate aldolase/4-hydroxy-	-1,9	-2
PP1138 <i>braF</i> -branched-chain amino acid ABC transporter ATP-bindin	1,8	1,9
PP1347 -glutathione S-transferase family protein	1,8	2,3
PP1348 -MutT/nudix family protein/thiamine-phosphate pyrophos	2,2	2,1
PP1691 -conserved hypothetical protein	-8,6	-2,8
PP1742 -conserved hypothetical protein	-3,9	-2,4
PP1972 <i>tyrB</i> -1-aromatic-amino-acid aminotransferase	1,9	1,9
PP2251 -conserved hypothetical protein	-1,8	-1,8
PP2432 -oxygen-insensitive NAD(P)H nitroreductase	1,9	1,8
PP2856 -conserved hypothetical protein	-2,1	-2,5
PP2928 -conserved hypothetical protein	1,9	2,1
PP3128 -exopolysaccharide biosynthesis/transport protein put	-2,0	-2
PP3179 -transcriptional regulator LysR family	-1,8	-2,1
PP3365 -acetolactate synthase catabolic putative	1,8	2
PP3704 -hypothetical protein	-1,9	-1,8
PP3710 -hypothetical protein	2,0	2,9
PP3764 -porin putative	-1,8	-1,9
PP3840 -hypothetical protein	-1,9	-1,9
PP4013 -MutT/nudix family protein	2,3	2,7
PP4178 -dienelactone hydrolase family protein	2,0	1,9
PP4261 -cation-transporting P-type ATPase	-2	-1,8
PP4377 -flagellin FlaG putative	1,8	2,1
PP4378 <i>fliC</i> -flagellin FliC	2,3	2
PP4619 -maleylacetoacetate isomerase putative	1,9	1,9
PP4696 -nitrogen regulation protein NR(I)	-1,9	-3,3
PP4728 <i>grpE</i> -heat shock protein GrpE	2,2	1,9
PP5029 <i>hutG</i> -formiminoglutamase	2,7	3,3
PP5086 -thermonuclease family protein	1,9	2,2
PP5232 -conserved hypothetical protein	2,6	1,8
PP5338 <i>aspA</i> -aspartate ammonia-lyase	2,0	2,6
PP5375 -transcriptional regulator LysR family	-2,2	-2,5

Tabla S4. Listado de los genes diferencialmente expresados en el array 1 y/o 2, ordenados en categorías. En verde se muestran aquellos genes más expresados en fondos CbrB⁺, mientras en rojo aquellos más expresados en fondos CbrB⁻.

Descripción	Proceso
Transporte/ metabolismo de aminoácidos	
Transporte	
PP0137 <i>gltP</i> -proton/sodium-glutamate/aspartate symporter	Transporte de glutamato/ aspartato
PP1002 <i>arcD</i> -arginine/ornithine antiporter	Transporte arginina/ ornitina
PP1036 -periplasmic binding domain/transglycosylase SLT domain	
PP1059 -amino acid permease	
PP1068 -amino acid ABC transporter ATP-binding protein	
PP1069 -amino acid ABC transporter permease protein	
PP1070 -amino acid ABC transporter permease protein	
PP1138 <i>braF</i> -branched-chain amino acid ABC transporter ATP-binding	
PP1141 <i>braC</i> -branched-chain amino acid ABC transporter periplasmic	
PP1297 <i>aapJ</i> -general amino acid ABC transporter periplasmic binding	
Metabolismo	
PP0864 -ornithine decarboxylase putative	Metabolismo ornitina
PP1001 <i>arcA</i> -arginine deiminase	Metabolismo arginina
PP1768 <i>serC</i> -3-phosphoserine aminotransferase	
PP1972 <i>tyrB</i> -1-aromatic-amino-acid aminotransferase	Metabolismo tirosina
PP2453 <i>ansA</i> -L-asparaginase II	Metabolismo ornitina
PP3533 -ornithine cyclodeaminase	Metabolismo de asparagina/ glutamina
PP4064 <i>ivd</i> -isovaleryl-CoA dehydrogenase	Metabolismo leucina/ valina
PP4065 -3-methylcrotonyl-CoA carboxylase beta subunit putative	Metabolismo isoleucina
PP4403 <i>bkdB</i> -2-oxoisovalerate dehydrogenase lipoamide acyltransferase	Metabolismo leucina/ isoleucina/ valina
PP4547 -glutamine synthetase putative	Metabolismo glutamato
PP4619 -maleylacetoacetate isomerase putative	Metabolismo tirosina
PP5029 <i>hutG</i> -formiminoglutamase	Metabolismo histidina
PP5032 <i>hutH</i> -histidine ammonia-lyase	Metabolismo histidina
PP5030 <i>hutI</i> -imidazolonepropionase	Metabolismo histidina
PP5338 <i>aspA</i> -aspartate ammonia-lyase	Metabolismo aspártico
PP5193 <i>gcvH</i> -2-glycine cleavage system H protein	Metabolismo glicina
Transporte/metabolismo del carbono	
PP0792 <i>fruR</i> -fructose transport system repressor FruR	
PP1022 <i>zwf-1</i> -glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	Ruta pentosas fosfato
PP1023 <i>pgl</i> -6-phosphogluconolactonase	Ruta pentosas fosfato
PP1024 <i>eda</i> -2-dehydro-3-deoxyphosphogluconate aldolase	Ruta pentosas fosfato
PP1169 <i>dctP</i> -TRAP dicarboxylate transporter DctP subunit	Transporte de dicarboxilatos
PP1743 <i>actP</i> -sodium:acetate symporter	Transporte de acetato
PP2454 <i>rbsB</i> -ribose ABC transporter periplasmic ribose-binding protein	Transporte de ribosa
PP3163 <i>benC</i> -benzoate dioxygenase ferredoxin reductase component	Metabolismo de benzoato
PP3745 <i>glcD</i> -glycolate oxidase subunit GlcD	
PP4012 -isocitrate dehydrogenase NADP-dependent monomeric-t	Ciclo de Krebs
PP4063 -long-chain-fatty-acid-CoA ligase putative	

PP4116 <i>aceA</i> -isocitrate lyase	Ciclo del glioxilato
PP4487 <i>acsA</i> -acetyl-coA synthetase	
PP5365 -cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase putative	
PP3122 -CoA-transferase subunit A putative	
PP3365 -acetolactate synthase catabolic putative	
PP4724 <i>carA</i> -carbamoyl-phosphate synthase small subunit	
PP4737 -D-lactate dehydrogenase putative	
PP5346 <i>oadA</i> -oxaloacetate decarboxylase alpha subunit	
Adhesión celular, movilidad o quimiotaxis	
PP0320 -methyl-accepting chemotaxis transducer	Quimiotaxis
PP0806 - <i>lapF</i> - surface adhesion protein putative	Adhesina
PP1155 -YaiC/YhcK/ArdA family protein, diguanylate cyclase	Diguanilato ciclasa
PP1371 -methyl-accepting chemotaxis transducer	Quimiotaxis
PP3126 -polysaccharide export protein putative	Transporte/síntesis polisacárido
PP3128 -exopolysaccharide biosynthesis/transport protein putative	Transporte/síntesis polisacárido
PP3932 -GGDEF domain protein	Diguanilato ciclasa
PP4333 -CheW domain protein	Cluster flagelo/quimiotaxis
PP4377 -flagellin FlaG putative	Cluster flagelo/quimiotaxis
PP4378 <i>fliC</i> -flagellin FliC	Cluster flagelo/quimiotaxis
PP4383 <i>flgI</i> -flagellar P-ring protein precursor FlgI	Cluster flagelo/quimiotaxis
Respuesta a estrés	
PP0915 <i>sodB</i> -superoxide dismutase (Fe)	Estrés oxidativo
PP1005 <i>hemO</i> -heme oxygenase	Metabolismo grupos hemo
PP1083 -bacterioferritin-associated ferredoxin putative	
PP1209 -cold-shock domain family protein	
PP1360 <i>groES</i> -chaperonin 10 kDa	
PP1361 <i>groEL</i> -chaperonin 60 kDa	
PP2439 <i>ahpC</i> -alkyl hydroperoxide reductase C subunit	
PP3155 -outer membrane ferric siderophore receptor putative	Transporte de hierro
PP4261 -cation-transporting P-type ATPase	Transporte de metales
PP4727 <i>dnaK</i> -dnaK protein	
PP4728 <i>grpE</i> -heat shock protein GrpE	
PP5000 <i>hslV</i> -heat shock protein HslV	
PP5001 <i>hslU</i> -heat shock protein HslVU ATPase subunit HslU	
PP5322 -metal ion transporter putative	Transporte de metales
Reguladores	
PP0191 <i>pfrA</i> -transcriptional regulator PfrA	Homeostasis del hierro
PP0537 -transcriptional regulator putative	
PP1182 -sensor histidine kinase	
PP2220 -C4-type zinc finger protein DksA/TraR family	
PP3179 -transcriptional regulator LysR family	
PP3412 -DNA-binding response regulator LuxR family	
PP3439 -transcriptional regulator AraC family	
PP3835 -sensory box histidine kinase	
PP4244 <i>pfrI</i> -ferric regulator PfrI	Homeostasis del hierro

PP4693 -C4-type zinc finger protein DksA/TraR family	
PP4696 - <i>cbrB</i> -nitrogen regulation protein NR(I)	
PP4781 -sensor histidine kinase	
PP4787 -PhoH family protein	
PP5350 -transcriptional regulator RpiR family	
PP5375 -transcriptional regulator LysR family	
PP5383 <i>copR</i> -transcriptional activator CopR	Resistencia a metales pesados
PP5384 <i>copS</i> -sensor protein CopS	Resistencia a metales pesados
Otros	
PP0012 <i>recF</i> -DNA replication and repair protein RecF	Metabolismo DNA
PP0268 <i>oprQ</i> -outer membrane protein OprE3	Transporte
PP0354 -CBS domain protein	
PP0542 -ethanolamine ammonia-lyase light subunit putative	Metabolismo energético
PP0638 -ISPPu15 transposase Orf1	
PP0883 -porin putative OprD family	Transporte
PP1157 -acetolactate synthase catabolic putative	Metabolismo energético
PP1185 <i>oprH</i> -outer membrane protein H1	Transporte
PP1347 -glutathione S-transferase family protein	
PP1348 -MutT/nudix family protein/thiamine-phosphate pyrophos	Metabolismo de DNA
PP1594 <i>frr</i> -ribosome recycling factor	Síntesis de proteínas
PP1797 -HlyD family secretion protein	Transporte
PP1815 <i>pyrF</i> -orotidine 5-phosphate decarboxylase	Metabolismo pirimidinas
PP1905 <i>rne</i> -ribonuclease E	Transcripción, procesamiento RNA
PP1912 <i>pIsX</i> -fatty acid/phospholipid synthesis protein PIsX	Metabolismo glicerolípidos
PP1962 -site-specific recombinase phage integrase family	
PP2206 -peptidase U32 family	Degradación de proteínas
PP2273 -DNA polymerase	
PP2297 -integrative genetic elementPPu40 integrase	
PP2366 -antibiotic MFS transporter putative	Transporte
PP2432 -oxygen-insensitive NAD(P)H nitroreductase	Metabolismo energético
PP2465 <i>thrS</i> -threonyl-tRNA synthetase	Síntesis de proteínas
PP2512 <i>foIE</i> -2-GTP cyclohydrolase I	Biosíntesis folato
PP3764 -porin putative OprD family	Transporte
PP3878 -phage minor capsid protein C putative	
PP3931 -transporter sodium/sulfate symporter family	Transporte
PP4013 -MutT/nudix family protein	Metabolismo DNA
PP4103 -low-affinity inorganic phosphate transporter	Transporte
PP4118 -membrane protein putative	Transporte
PP4178 -dienelactone hydrolase family protein	Metabolismo energético
PP4201 -electron transfer flavoprotein alpha subunit	Metabolismo energético
PP4202 -electron transfer flavoprotein beta subunit	Metabolismo energético
PP4252 <i>ccoQ-1</i> -cytochrome c oxidase cbb3-type CcoQ subunit	Metabolismo energético
PP4253 <i>ccoP-1</i> -cytochrome c oxidase cbb3-type subunit III	Metabolismo energético
PP4334 -ParA family protein	
PP4493 -oxidoreductase putative	
PP4578 -major facilitator family transporter	Transporte

PP4624 -hydrolase alpha/beta fold family	
PP4737 -D-lactate dehydrogenase putative	Metabolismo energético
PP4822 <i>purH</i> -phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransfe	Biosíntesis purinas
PP5086 -thermonuclease family protein	Metabolismo DNA
PP5092 -NLP/P60 family protein	
PP5117 -hydrolase alpha/beta fold family	
PP5165 -lipoprotein putative	Transporte
PP5203 -5-formyltetrahydrofolate cyclo-ligase family protein	
PP5206 -membrane fusion protein	
PP5207 -ABC transporter ATP-binding protein/permease protein	
PP5208 -ABC transporter permease protein	
PP5335 <i>purK</i> -phosphoribosylaminoimidazole carboxylase ATPase subu	Biosíntesis purinas
PP5365 -cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase putative	Metabolismo de fosfolípidos
Proteínas hipotéticas	
PP0266 -conserved hypothetical protein	
PP0750 -conserved hypothetical protein	
PP0998 -conserved hypothetical protein	
PP1178 -hypothetical protein	
PP1582 -hypothetical protein	
PP1690 -conserved hypothetical protein	
PP1691 -conserved hypothetical protein	
PP1729 -hypothetical protein	
PP1742 -conserved hypothetical protein	
PP1794 -hypothetical protein	
PP2161 -conserved hypothetical protein	
PP2251 -conserved hypothetical protein	
PP2292 -hypothetical protein	
PP2296 -hypothetical protein	
PP2853 -conserved hypothetical protein	
PP2856 -conserved hypothetical protein	
PP2874 -hypothetical protein	
PP2928 -conserved hypothetical protein	
PP3027 -conserved hypothetical protein	
PP3089 -conserved hypothetical protein	
PP3131 -hypothetical protein	
PP3306 -hypothetical protein	
PP3317 -hypothetical protein	
PP3699 -hypothetical protein	
PP3704 -hypothetical protein	
PP3710 -hypothetical protein	
PP3840 -hypothetical protein	
PP3901 -conserved hypothetical protein	
PP3909 -hypothetical protein	
PP4070 -hypothetical protein	
PP4115 -conserved hypothetical protein	
PP4569 -hypothetical protein	

PP4981 -conserved hypothetical protein

PP5151 -conserved hypothetical protein

PP5232 -conserved hypothetical protein

PP5390 -hypothetical protein

PP5391 -hypothetical protein

Tabla S5. Intersección de los regulones de CbrB y Crc ^(a) de *P. putida*. En verde se muestran aquellos genes más expresados en un fondo silvestre para CbrB o Crc, y en rojo aquéllos con mayor expresión en un fondo *cbrB*⁻ o *crc*⁻.

Descripción	wt/ <i>cbrB</i>	<i>ntrC</i> / <i>cbrBntrC</i>	wt/ <i>crc</i> transcr.	wt/ <i>crc</i> proteo.
PP2439 <i>ahpC</i> -alkyl hydroperoxide reductase C subunit		1,9	-4,6	
PP5001 <i>hslU</i> -heat shock protein HslVU ATPase subunit HslU	1,8		-2	
PP1001 <i>arcA</i> -arginine deiminase	-3,1	-2,7		-1,5
PP1024 <i>eda</i> -2-dehydro-3-deoxyphosphogluconate aldolase/4-hydroxy-	-1,9	-2,0		-2,1
PP2453 <i>ansA</i> -L-asparaginase II		2,4	-2,4	-3,1
PP3122 -CoA-transferase subunit A putative	2,4		-11,6	-6,3
PP4064 <i>ivd</i> -isovaleryl-CoA dehydrogenase		-2,4	-5,3	-2,3
PP4065 -3-methylcrotonyl-CoA carboxylase beta subunit putat		-3,0	-5,6	-3,9
PP4403 <i>bkdB</i> -2-oxoisovalerate dehydrogenase lipoamide acyltransfe	2,1		-2,9	-12,1
PP4619 -maleylacetoacetate isomerase putative	1,9	1,9	-6,2	
PP4737 -D-lactate dehydrogenase putative		2,1	4,5	
PP5338 <i>aspA</i> -aspartate ammonia-lyase	2,0	2,6		-1,5
PP5346 <i>oadA</i> -oxaloacetate decarboxylase alpha subunit	2,0		-4,2	-4,9
PP4063 -long-chain-fatty-acid-CoA ligase putative		-1,9	-3,5	
PP0792 <i>fruR</i> - fructose transport system repressor FruR		-1,9		-2,3
PP0268 <i>oprQ</i> -outer membrane protein OprE3	1,9	2,4		-1,7
PP0883 -porin putative	2,4		-1,5	-3,5
PP1059 -amino acid permease	2,1		-6,4	
PP1068 -amino acid ABC transporter ATP-binding protein	2,3		-3,4	
PP1069 -amino acid ABC transporter permease protein		1,9	-3,1	
PP1070 -amino acid ABC transporter permease protein		1,8	-3,9	
PP1141 <i>braC</i> -branched-chain amino acid ABC transporter periplasmic	1,8		-1,8	-2,9
PP1297 <i>aapJ</i> -general amino acid ABC transporter periplasmic binding	1,9		2,4	
PP2454 <i>rbsB</i> -ribose ABC transporter periplasmic ribose-binding protein		-1,9	-1,8	-3,8
PP3764 -porin putative	-1,8	-1,9	2,9	
PP4578 -major facilitator family transporter		1,8	-7,3	

(a) (Moreno y col., 2009a)

Moreno, R., M. Martinez-Gomariz, et al. (2009). "The *Pseudomonas putida* Crc global regulator controls the hierarchical assimilation of amino acids in a complete medium: evidence from proteomic and genomic analyses." *Proteomics* 9(11): 2910-2928

Tabla S6. Datos crudos obtenidos mediante Phenotype Microarrays. Se muestran los compuestos en los que las estirpes mostraron actividad metabólica diferencial, expresada como *score*, calculado como la diferencia entre el área de la estirpe menos aquella del mutante *cbrB* (MPO406). PM indica el número de la microplaca, señalando la posición del compuesto como letra la fila y como número la columna. En la columna denominada “Fuente” se indica si el compuesto constituye fuente de carbon (C-source) o fuente de nitrógeno (N-source).

Placa	Posición	Score	Compuesto	Fuente
PM01	H12	-134	Ethanolamine	C-source
PM02A	E12	-114	5-Keto-D-Gluconic Acid	C-source
PM01	B12	-78	L-Glutamic Acid	C-source
PM02A	D12	-77	Butyric Acid	C-source
PM02A	G10	-75	L-Leucine	C-source
PM02A	D10	-74	g-Amino-Butyric Acid	C-source
PM02A	E10	-67	a-Keto-Valeric Acid	C-source
PM02A	F07	-60	D-Ribono-1;4-Lactone	C-source
PM01	B05	-59	D-Glucuronic Acid	C-source
PM07	G06	-106	Tyr-Gln	N-source
PM07	G07	-104	Tyr-Glu	N-source
PM07	G08	-99	Tyr-Gly	N-source
PM07	G09	-91	Tyr-His	N-source
PM07	G05	-90	Tyr-Ala	N-source
PM06	C05	-83	Arg-Tyr	N-source
PM07	B05	-80	Lys-Tyr	N-source
PM07	H10	-76	Val-Tyr	N-source
PM06	D12	-76	Glu-Tyr	N-source
PM03B	G03	-75	Uric Acid	N-source
PM07	E09	-72	Ser-Tyr	N-source
PM07	H03	-71	Val-Arg	N-source
PM07	F07	-71	Trp-Arg	N-source
PM06	A02	-70	L-Glutamine	N-source
PM07	A11	-63	Lys-Lys	N-source
PM06	B04	-63	Ala-Tyr	N-source
PM06	H05	-61	Leu-Arg	N-source
PM08	E05	-60	Tyr-Val	N-source
PM07	G12	-60	Tyr-Phe	N-source
PM07	G10	-60	Tyr-Leu	N-source
PM06	H07	-59	Leu-Glu	N-source
PM03B	H03	-59	Ala-Glu	N-source
PM06	C02	-58	Arg-Phe	N-source
PM06	A06	-58	Ala-Glu	N-source
PM06	E01	-57	Glu-Val	N-source
PM06	A04	-57	Ala-Arg	N-source
PM07	H04	-55	Val-Asn	N-source
PM03B	G12	-54	a-Amino-N-Valeric Acid	N-source
PM06	C12	-54	Asp-Lys	N-source
PM07	G11	-53	Tyr-Lys	N-source
PM03B	B08	-53	L-Phenylalanine	N-source
PM06	A08	-52	Ala-His	N-source
PM07	C05	-52	Met-Phe	N-source
PM03B	H05	-52	Ala-His	N-source

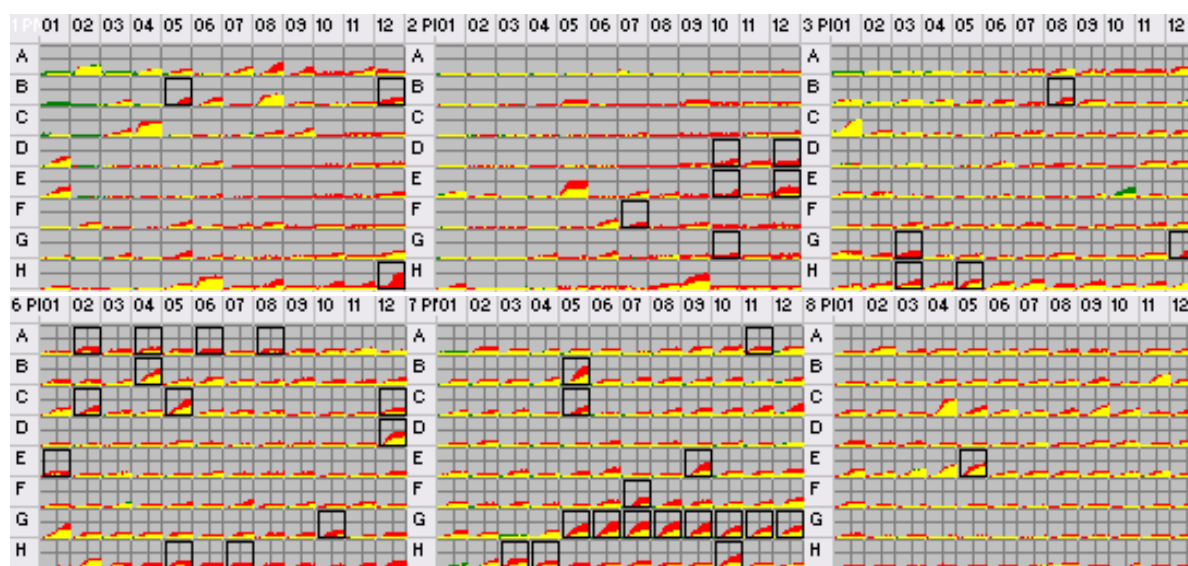


Figura S1. Actividad metabólica *P. putida* KT2442 silvestre y MPO406 con múltiples fuentes de carbono y nitrógeno. Se muestran las gráficas suministradas por Biolog inc. Para las placas PM1-3 y PM6-8, en las que se representa la actividad metabólica de ambas estirpes en presencia de distintas fuentes de carbono y nitrógeno. En rojo se muestra el área bajo las curvas de la estirpe silvestre, en verde del mutante MPO406 y en amarillo la intersección de ambas. El score (en la tabla S6) se atribuye La diferencia de tales áreas. Con cajas negras se indican los compuestos que mostraron actividad diferencial en dos repeticiones.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Abdou, L., H. T. Chou, D. Haas y C. D. Lu, (2011) Promoter recognition and activation by the global response regulator CbrB in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 193: 2784-2792.
- Adaikkalam, V. y S. Swarup, (2005) Characterization of copABCD operon from a copper-sensitive *Pseudomonas putida* strain. *Can J Microbiol* 51: 209-216.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller y D. J. Lipman, (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389-3402.
- Amador, C. I., I. Canosa, F. Govantes y E. Santero, (2010) Lack of CbrB in *Pseudomonas putida* affects not only amino acids metabolism but also different stress responses and biofilm development. *Environ Microbiol* 12: 1748-1761.
- Ames, P., C. A. Studdert, R. H. Reiser y J. S. Parkinson, (2002) Collaborative signaling by mixed chemoreceptor teams in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 7060-7065.
- Amikam, D. y M. Benziman, (1989) Cyclic diguanylic acid and cellulose synthesis in *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* 171: 6649-6655.
- Arias-Barrau, E., E. R. Olivera, J. M. Luengo, C. Fernandez, B. Galan, J. L. Garcia, E. Diaz y B. Minambres, (2004) The homogentisate pathway: a central catabolic pathway involved in the degradation of L-phenylalanine, L-tyrosine, and 3-hydroxyphenylacetate in *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol* 186: 5062-5077.
- Arora, S. K., B. W. Ritchings, E. C. Almira, S. Lory y R. Ramphal, (1997) A transcriptional activator, FleQ, regulates mucin adhesion and flagellar gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* in a cascade manner. *J Bacteriol* 179: 5574-5581.
- Bagdasarian, M., R. Lurz, B. Ruckert, F. C. Franklin, M. M. Bagdasarian, J. Frey y K. N. Timmis, (1981) Specific-purpose plasmid cloning vectors. II. Broad host range, high copy number, RSF1010-derived vectors, and a host-vector system for gene cloning in *Pseudomonas*. *Gene* 16: 237-247.
- Bao, Y., D. P. Lies, H. Fu y G. P. Roberts, (1991) An improved Tn7-based system for the single-copy insertion of cloned genes into chromosomes of gram-negative bacteria. *Gene* 109: 167-168.
- Barken, K. B., S. J. Pamp, L. Yang, M. Gjermansen, J. J. Bertrand, M. Klausen, M. Givskov, C. B. Whitchurch, J. N. Engel y T. Tolker-Nielsen, (2008) Roles of type IV pili, flagellum-mediated motility and extracellular DNA in the formation of mature multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environ Microbiol* 10: 2331-2343.
- Barrios, H., B. Valderrama y E. Morett, (1999) Compilation and analysis of sigma(54)-dependent promoter sequences. *Nucleic Acids Res* 27: 4305-4313.
- Bender, R. A., (1991) The role of the NAC protein in the nitrogen regulation of *Klebsiella aerogenes*. *Mol Microbiol* 5: 2575-2580.
- Benjamini, Y., D. Drai, G. Elmer, N. Kafkafi y I. Golani, (2001) Controlling the false discovery rate in behavior genetics research. *Behav Brain Res* 125: 279-284.
- Blatny, J. M., T. Brautaset, H. C. Winther-Larsen, K. Haugan y S. Valla, (1997) Construction and use of a versatile set of broad-host-range cloning and expression vectors based on the RK2 replicon. *Appl Environ Microbiol* 63: 370-379.
- Bochner, B. R., (1989) Sleuthing out bacterial identities. *Nature* 339: 157-158.
- Boronin, A. M., (1992) Diversity of *Pseudomonas* plasmids: to what extent? *FEMS Microbiol Lett* 79: 461-467.

- Browne, P., M. Barret, F. O'Gara y J. P. Morrissey, (2010) Computational prediction of the Crc regulon identifies genus-wide and species-specific targets of catabolite repression control in *Pseudomonas* bacteria. *BMC Microbiol* 10: 300.
- Buck, M., M. T. Gallegos, D. J. Studholme, Y. Guo y J. D. Gralla, (2000) The bacterial enhancer-dependent sigma(54) (sigma(N)) transcription factor. *J Bacteriol* 182: 4129-4136.
- Caille, O., C. Rossier y K. Perron, (2007) A copper-activated two-component system interacts with zinc and imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 189: 4561-4568.
- Cardozo, M. J., D. A. Massazza, J. S. Parkinson y C. A. Studdert, (2010) Disruption of chemoreceptor signalling arrays by high levels of CheW, the receptor-kinase coupling protein. *Mol Microbiol* 75: 1171-1181.
- Carmona, M., F. Claverie-Martin y B. Magasanik, (1997) DNA bending and the initiation of transcription at sigma54-dependent bacterial promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 9568-9572.
- Cases, I., D. W. Ussery y V. de Lorenzo, (2003) The sigma54 regulon (sigmulon) of *Pseudomonas putida*. *Environ Microbiol* 5: 1281-1293.
- Collier, D. N., P. W. Hager y P. V. Phibbs, Jr., (1996) Catabolite repression control in the *Pseudomonads*. *Res Microbiol* 147: 551-561.
- Cox, M., G. Gerritse, L. Dankmeyer y W. J. Quax, (2001) Characterization of the promoter and upstream activating sequence from the *Pseudomonas alcaligenes* lipase gene. *J Biotechnol* 86: 9-17.
- Cunliffe, H. E., T. R. Merriman y I. L. Lamont, (1995) Cloning and characterization of *pvdS*, a gene required for pyoverdine synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: PvdS is probably an alternative sigma factor. *J Bacteriol* 177: 2744-2750.
- Choi, K. H., A. Kumar y H. P. Schweizer, (2006) A 10-min method for preparation of highly electrocompetent *Pseudomonas aeruginosa* cells: application for DNA fragment transfer between chromosomes and plasmid transformation. *J Microbiol Methods* 64: 391-397.
- D'Argenio, D. A., M. W. Calfee, P. B. Rainey y E. C. Pesci, (2002) Autolysis and autoaggregation in *Pseudomonas aeruginosa* colony morphology mutants. *J Bacteriol* 184: 6481-6489.
- Dasgupta, N., M. C. Wolfgang, A. L. Goodman, S. K. Arora, J. Jyot, S. Lory y R. Ramphal, (2003) A four-tiered transcriptional regulatory circuit controls flagellar biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 50: 809-824.
- Davies, D. G. y C. N. Marques, (2009) A fatty acid messenger is responsible for inducing dispersion in microbial biofilms. *J Bacteriol* 191: 1393-1403.
- de Lorenzo, V. y K. N. Timmis, (1994) Analysis and construction of stable phenotypes in gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons. *Methods Enzymol* 235: 386-405.
- del Castillo, T., J. L. Ramos, J. J. Rodriguez-Herva, T. Fuhrer, U. Sauer y E. Duque, (2007) Convergent peripheral pathways catalyze initial glucose catabolism in *Pseudomonas putida*: genomic and flux analysis. *J Bacteriol* 189: 5142-5152.
- del Castillo, T., E. Duque y J. L. Ramos, (2008) A set of activators and repressors control peripheral glucose pathways in *Pseudomonas putida* to yield a common central intermediate. *J Bacteriol* 190: 2331-2339.
- Domínguez-Cuevas, P. y S. Marqués, (2004) Compiling sigma 70-dependent promoters. In: *Pseudomonas*. J. L. Ramos (ed). Nueva York: Plenum Publisher, pp. 345-364.

- Dos Santos, V., K. Timmis, B. Tummler y C. Weinel, (2004) Genomic features of *Pseudomonas putida* strain KT2440. In: *Pseudomonas*. J. L. Ramos (ed). New York: Plenum Publisher, pp. 77-112.
- Drummond, M. H., A. Contreras y L. A. Mitchenall, (1990) The function of isolated domains and chimaeric proteins constructed from the transcriptional activators NifA and NtrC of *Klebsiella pneumoniae*. *Mol Microbiol* 4: 29-37.
- Dunn, N. W. y I. C. Gunsalus, (1973) Transmissible plasmid coding early enzymes of naphthalene oxidation in *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol* 114: 974-979.
- Erb, R. W., C. A. Eichner, I. Wagner-Dobler y K. N. Timmis, (1997) Bioprotection of microbial communities from toxic phenol mixtures by a genetically designed pseudomonad. *Nat Biotechnol* 15: 378-382.
- Espinosa-Urgel, M., R. Kolter y J. L. Ramos, (2002) Root colonization by *Pseudomonas putida*: love at first sight. *Microbiology* 148: 341-343.
- Figurski, D. H. y D. R. Helinski, (1979) Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 1648-1652.
- Franklin, F. C., M. Bagdasarian, M. M. Bagdasarian y K. N. Timmis, (1981) Molecular and functional analysis of the TOL plasmid pWWO from *Pseudomonas putida* and cloning of genes for the entire regulated aromatic ring meta cleavage pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78: 7458-7462.
- Galan, B., E. Diaz y J. L. Garcia, (2000) Enhancing desulphurization by engineering a flavin reductase-encoding gene cassette in recombinant biocatalysts. *Environ Microbiol* 2: 687-694.
- Galperin, M. Y., (2010) Diversity of structure and function of response regulator output domains. *Curr Opin Microbiol* 13: 150-159.
- Garcia-Gonzalez, V., F. Govantes, O. Porrua y E. Santero, (2005) Regulation of the *Pseudomonas* sp. strain ADP cyanuric acid degradation operon. *J Bacteriol* 187: 155-167.
- Gjermansen, M., M. Nilsson, L. Yang y T. Tolker-Nielsen, (2010) Characterization of starvation-induced dispersion in *Pseudomonas putida* biofilms: genetic elements and molecular mechanisms. *Mol Microbiol* 75: 815-826.
- Goldberg, A. L., (2003) Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature* 426: 895-899.
- Govantes, F., J. A. Albrecht y R. P. Gunsalus, (2000) Oxygen regulation of the *Escherichia coli* cytochrome d oxidase (cydAB) operon: roles of multiple promoters and the Fnr-1 and Fnr-2 binding sites. *Mol Microbiol* 37: 1456-1469.
- Gruber, T. M. y C. A. Gross, (2003) Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space. *Annu Rev Microbiol* 57: 441-466.
- Gunn, J. S. y S. I. Miller, (1996) PhoP-PhoQ activates transcription of pmrAB, encoding a two-component regulatory system involved in *Salmonella typhimurium* antimicrobial peptide resistance. *J Bacteriol* 178: 6857-6864.
- Haagensen, J. A., M. Klausen, R. K. Ernst, S. I. Miller, A. Folkesson, T. Tolker-Nielsen y S. Molin, (2007) Differentiation and distribution of colistin- and sodium dodecyl sulfate-tolerant cells in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J Bacteriol* 189: 28-37.
- Haas, D., H. Matsumoto, P. Moretti, V. Stalon y A. Mercenier, (1984) Arginine degradation in *Pseudomonas aeruginosa* mutants blocked in two arginine catabolic pathways. *Mol Gen Genet* 193: 437-444.
- Hanahan, D., (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166: 557-580.

- Harshey, R. M., (1994) Bees aren't the only ones: swarming in gram-negative bacteria. *Mol Microbiol* 13: 389-394.
- Harshey, R. M., (2003) Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Annu Rev Microbiol* 57: 249-273.
- Helmann, J. D. y M. J. Chamberlin, (1988) Structure and function of bacterial sigma factors. *Annu Rev Biochem* 57: 839-872.
- Helmann, J. D., (1991) Alternative sigma factors and the regulation of flagellar gene expression. *Mol Microbiol* 5: 2875-2882.
- Herrero, M., V. de Lorenzo y K. N. Timmis, (1990) Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J Bacteriol* 172: 6557-6567.
- Hervas, A. B., I. Canosa y E. Santero, (2008) Transcriptome analysis of *Pseudomonas putida* in response to nitrogen availability. *J Bacteriol* 190: 416-420.
- Hervas, A. B., I. Canosa, R. Little, R. Dixon y E. Santero, (2009) NtrC-dependent regulatory network for nitrogen assimilation in *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol* 191: 6123-6135.
- Hervas, A. B., I. Canosa y E. Santero, (2010) Regulation of glutamate dehydrogenase expression in *Pseudomonas putida* results from its direct repression by NtrC under nitrogen-limiting conditions. *Mol Microbiol* 78: 305-319.
- Hibbing, M. E. y C. Fuqua, (2012) Inhibition and dispersal of *Agrobacterium tumefaciens* biofilms by a small diffusible *Pseudomonas aeruginosa* exoproduct(s). *Arch Microbiol* 194: 391-403.
- Hoang, T. T., R. R. Karkhoff-Schweizer, A. J. Kutchma y H. P. Schweizer, (1998) A broad-host-range FLP-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene* 212: 77-86.
- Holloway, B. W., (1955) Genetic recombination in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Gen Microbiol* 13: 572-581.
- Hoover, T. R., E. Santero, S. Porter y S. Kustu, (1990) The integration host factor stimulates interaction of RNA polymerase with NIFA, the transcriptional activator for nitrogen fixation operons. *Cell* 63: 11-22.
- Inoue, H., H. Nojima y H. Okayama, (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96: 23-28.
- Jacoby, G. A. y M. Matthew, (1979) The distribution of beta-lactamase genes on plasmids found in *Pseudomonas*. *Plasmid* 2: 41-47.
- Janes, B. K., C. J. Rosario y R. A. Bender, (2003) Isolation of a negative control mutant of the nitrogen assimilation control protein, NAC, in *Klebsiella aerogenes*. *J Bacteriol* 185: 688-692.
- Jann, A., V. Stalon, C. V. Wauven, T. Leisinger y D. Haas, (1986) N-Succinylated intermediates in an arginine catabolic pathway of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 4937-4941.
- Jimenez, J. I., B. Minambres, J. L. Garcia y E. Diaz, (2002) Genomic analysis of the aromatic catabolic pathways from *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol* 4: 824-841.
- Jishage, M. y A. Ishihama, (1999) Transcriptional organization and in vivo role of the *Escherichia coli* *rsd* gene, encoding the regulator of RNA polymerase sigma D. *J Bacteriol* 181: 3768-3776.
- Kasiakou, S. K., A. Michalopoulos, E. S. Soteriades, G. Samonis, G. J. Sermaides y M. E. Falagas, (2005) Combination therapy with intravenous colistin for management of infections due to

- multidrug-resistant Gram-negative bacteria in patients without cystic fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 3136-3146.
- Kato, J., T. Nakamura, A. Kuroda y H. Ohtake, (1999) Cloning and characterization of chemotaxis genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biosci Biotechnol Biochem* 63: 155-161.
- Kill, K., T. T. Binnewies, T. Sicheritz-Ponten, H. Willenbrock, P. F. Hallin, T. M. Wassenaar y D. W. Ussery, (2005) Genome update: sigma factors in 240 bacterial genomes. *Microbiology* 151: 3147-3150.
- Klose, K. E., A. K. North, K. M. Stedman y S. Kustu, (1994) The major dimerization determinants of the nitrogen regulatory protein NTRC from enteric bacteria lie in its carboxy-terminal domain. *J Mol Biol* 241: 233-245.
- Koch, B., L. E. Jensen y O. Nybroe, (2001) A panel of Tn7-based vectors for insertion of the gfp marker gene or for delivery of cloned DNA into Gram-negative bacteria at a neutral chromosomal site. *J Microbiol Methods* 45: 187-195.
- Kohler, T., J. M. Cayrol, J. L. Ramos y S. Harayama, (1989) Nucleotide and deduced amino acid sequence of the RpoN sigma-factor of *Pseudomonas putida*. *Nucleic Acids Res* 17: 10125.
- Kort, E. N., M. F. Goy, S. H. Larsen y J. Adler, (1975) Methylation of a membrane protein involved in bacterial chemotaxis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72: 3939-3943.
- Kovach, M. E., P. H. Elzer, D. S. Hill, G. T. Robertson, M. A. Farris, R. M. Roop, 2nd y K. M. Peterson, (1995) Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* 166: 175-176.
- Krell, T., J. Lacal, A. Busch, H. Silva-Jimenez, M. E. Guazzaroni y J. L. Ramos, (2010) Bacterial sensor kinases: diversity in the recognition of environmental signals. *Annu Rev Microbiol* 64: 539-559.
- Kristensen, C. S., L. Eberl, J. M. Sanchez-Romero, M. Givskov, S. Molin y V. De Lorenzo, (1995) Site-specific deletions of chromosomally located DNA segments with the multimer resolution system of broad-host-range plasmid RP4. *J Bacteriol* 177: 52-58.
- Krzeslak, J., G. Gerritse, R. van Merkerk, R. H. Cool y W. J. Quax, (2008) Lipase expression in *Pseudomonas alcaligenes* is under the control of a two-component regulatory system. *Appl Environ Microbiol* 74: 1402-1411.
- Krzeslak, J., E. Papaioannou, R. van Merkerk, K. A. Paal, R. Bischoff, R. H. Cool y W. J. Quax, (2012) Lipase A gene transcription in *Pseudomonas alcaligenes* is under control of RNA polymerase sigma54 and response regulator LipR. *FEMS Microbiol Lett* 329: 146-153.
- Kundu, T. K., S. Kusano y A. Ishihama, (1997) Promoter selectivity of *Escherichia coli* RNA polymerase sigmaF holoenzyme involved in transcription of flagellar and chemotaxis genes. *J Bacteriol* 179: 4264-4269.
- Laemmli, U. K., (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lambertsen, L., C. Sternberg y S. Molin, (2004) Mini-Tn7 transposons for site-specific tagging of bacteria with fluorescent proteins. *Environ Microbiol* 6: 726-732.
- Lasa, I. y J. R. Penades, (2006) Bap: a family of surface proteins involved in biofilm formation. *Res Microbiol* 157: 99-107.
- Ledebur, H., B. Gu, J. Sojda, 3rd y B. T. Nixon, (1990) *Rhizobium meliloti* and *Rhizobium leguminosarum* dctD gene products bind to tandem sites in an activation sequence located upstream of sigma 54-dependent dctA promoters. *J Bacteriol* 172: 3888-3897.

- Leoni, L., N. Orsi, V. de Lorenzo y P. Visca, (2000) Functional analysis of PvdS, an iron starvation sigma factor of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 182: 1481-1491.
- Levin, A. S., A. A. Barone, J. Penco, M. V. Santos, I. S. Marinho, E. A. Arruda, E. I. Manrique y S. F. Costa, (1999) Intravenous colistin as therapy for nosocomial infections caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Clin Infect Dis* 28: 1008-1011.
- Li, W. y C. D. Lu, (2007) Regulation of carbon and nitrogen utilization by CbrAB and NtrBC two-component systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 189: 5413-5420.
- Linares, J. F., R. Moreno, A. Fajardo, L. Martinez-Solano, R. Escalante, F. Rojo y J. L. Martinez, (2010) The global regulator Crc modulates metabolism, susceptibility to antibiotics and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol* 12: 3196-3212.
- Lugtenberg, B. J. J. y G. V. Bloemberg, (2004) Life in the Rhizosphere. In: *Pseudomonas*. J. L. Ramos (ed). New York: Plenum Publisher, pp. 403-430.
- Lujan, A. M., M. D. Macia, L. Yang, S. Molin, A. Oliver y A. M. Smania, (2011) Evolution and adaptation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms driven by mismatch repair system-deficient mutators. *PLoS One* 6: e27842.
- Macnab, R. M., (1996) *Escherichia coli* and *Salmonella*, Cellular and Molecular Biology. In: N. F. C (ed). Washington D.C.: American Society of Microbiology, pp. 123-145.
- Maloy, S. y V. Stewart, (1993) Autogenous regulation of gene expression. *J Bacteriol* 175: 307-316.
- Maloy, S. R., (1987) The proline utilization. In: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. F. C. Neidhart, J. L. Ingraham, K. B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter y H. E. Umbarger (eds). Washington D.C.: American Society for Microbiology, pp. 1513-1519.
- Mandelbaum, R. T., L. P. Wackett y D. L. Allan, (1993) Mineralization of the s-triazine ring of atrazine by stable bacterial mixed cultures. *Appl Environ Microbiol* 59: 1695-1701.
- Martinez-Bueno, M. A., R. Tobes, M. Rey y J. L. Ramos, (2002) Detection of multiple extracytoplasmic function (ECF) sigma factors in the genome of *Pseudomonas putida* KT2440 and their counterparts in *Pseudomonas aeruginosa* PA01. *Environ Microbiol* 4: 842-855.
- Martinez-Gil, M., F. Yousef-Coronado y M. Espinosa-Urgel, (2010) LapF, the second largest *Pseudomonas putida* protein, contributes to plant root colonization and determines biofilm architecture. *Mol Microbiol* 77: 549-561.
- Matilla, M. A., J. L. Ramos, E. Duque, J. de Dios Alche, M. Espinosa-Urgel y M. I. Ramos-Gonzalez, (2007) Temperature and pyoverdine-mediated iron acquisition control surface motility of *Pseudomonas putida*. *Environ Microbiol* 9: 1842-1850.
- Matthijs, S., G. Laus, J. M. Meyer, K. Abbaspour-Tehrani, M. Schafer, H. Budzikiewicz y P. Cornelis, (2009) Siderophore-mediated iron acquisition in the entomopathogenic bacterium *Pseudomonas entomophila* L48 and its close relative *Pseudomonas putida* KT2440. *Biometals* 22: 951-964.
- McPhee, J. B., S. Lewenza y R. E. Hancock, (2003) Cationic antimicrobial peptides activate a two-component regulatory system, PmrA-PmrB, that regulates resistance to polymyxin B and cationic antimicrobial peptides in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 50: 205-217.
- Menzel, R. y J. Roth, (1981a) Enzymatic properties of the purified putA protein from *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem* 256: 9762-9766.

- Menzel, R. y J. Roth, (1981b) Purification of the putA gene product. A bifunctional membrane-bound protein from *Salmonella typhimurium* responsible for the two-step oxidation of proline to glutamate. *J Biol Chem* 256: 9755-9761.
- Menzel, R. y J. Roth, (1981c) Regulation of the genes for proline utilization in *Salmonella typhimurium*: autogenous repression by the putA gene product. *J Mol Biol* 148: 21-44.
- Mermod, N., J. L. Ramos, P. R. Lehrbach y K. N. Timmis, (1986) Vector for regulated expression of cloned genes in a wide range of gram-negative bacteria. *J Bacteriol* 167: 447-454.
- Mills, E., I. S. Pultz, H. D. Kulasekara y S. I. Miller, (2011) The bacterial second messenger c-di-GMP: mechanisms of signalling. *Cell Microbiol* 13: 1122-1129.
- Moreno, R. y F. Rojo, (2008) The target for the *Pseudomonas putida* Crc global regulator in the benzoate degradation pathway is the BenR transcriptional regulator. *J Bacteriol* 190: 1539-1545.
- Moreno, R., M. Martinez-Gomariz, L. Yuste, C. Gil y F. Rojo, (2009a) The *Pseudomonas putida* Crc global regulator controls the hierarchical assimilation of amino acids in a complete medium: evidence from proteomic and genomic analyses. *Proteomics* 9: 2910-2928.
- Moreno, R., S. Marzi, P. Romby y F. Rojo, (2009b) The Crc global regulator binds to an unpaired A-rich motif at the *Pseudomonas putida* alkS mRNA coding sequence and inhibits translation initiation. *Nucleic Acids Res* 37: 7678-7690.
- Moreno, R., P. Fonseca y F. Rojo, (2012) Two small RNAs, CrcY and CrcZ, act in concert to sequester the Crc global regulator in *Pseudomonas putida*, modulating catabolite repression. *Mol Microbiol* 83: 24-40.
- Mueller, J. y E. Johnson, (1941) Acid hydrolysates of casein to replace petone in the preparation of bacteriological media. *Journal of Immunology* 40: 33-48.
- Nakada, Y., T. Nishijyo y Y. Itoh, (2002) Divergent structure and regulatory mechanism of proline catabolic systems: characterization of the putAP proline catabolic operon of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and its regulation by PruR, an AraC/XylS family protein. *J Bacteriol* 184: 5633-5640.
- Navarro, M. V., P. D. Newell, P. V. Krasteva, D. Chatterjee, D. R. Madden, G. A. O'Toole y H. Sondermann, (2011) Structural basis for c-di-GMP-mediated inside-out signaling controlling periplasmic proteolysis. *PLoS Biol* 9: e1000588.
- Nelson, K. E., C. Weinel, I. T. Paulsen, R. J. Dodson, H. Hilbert, V. A. Martins dos Santos, D. E. Fouts, S. R. Gill, M. Pop, M. Holmes, L. Brinkac, M. Beanan, R. T. DeBoy, S. Daugherty, J. Kolonay, R. Madupu, W. Nelson, O. White, J. Peterson, H. Khouri, I. Hance, P. Chris Lee, E. Holtzapple, D. Scanlan, K. Tran, A. Moazzez, T. Utterback, M. Rizzo, K. Lee, D. Kosack, D. Moestl, H. Wedler, J. Lauber, D. Stjepandic, J. Hoheisel, M. Straetz, S. Heim, C. Kiewitz, J. A. Eisen, K. N. Timmis, A. Dusterhoft, B. Tummler y C. M. Fraser, (2002) Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol* 4: 799-808.
- Newell, P. D., R. D. Monds y G. A. O'Toole, (2009) LapD is a bis-(3',5')-cyclic dimeric GMP-binding protein that regulates surface attachment by *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 3461-3466.
- Newell, P. D., C. D. Boyd, H. Sondermann y G. A. O'Toole, (2011) A c-di-GMP effector system controls cell adhesion by inside-out signaling and surface protein cleavage. *PLoS Biol* 9: e1000587.

- Nieuwkoop, A. J., S. A. Boylan y R. A. Bender, (1984) Regulation of hutUH operon expression by the catabolite gene activator protein-cyclic AMP complex in *Klebsiella aerogenes*. *J Bacteriol* 159: 934-939.
- Nishijyo, T., S. M. Park, C. D. Lu, Y. Itoh y A. T. Abdelal, (1998) Molecular characterization and regulation of an operon encoding a system for transport of arginine and ornithine and the ArgR regulatory protein in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 180: 5559-5566.
- Nishijyo, T., D. Haas y Y. Itoh, (2001) The CbrA-CbrB two-component regulatory system controls the utilization of multiple carbon and nitrogen sources in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 40: 917-931.
- Paget, M. S. y J. D. Helmann, (2003) The sigma70 family of sigma factors. *Genome Biol* 4: 203.
- Palleroni, N. J. y R. B. Moore, (2004) Taxonomy of *Pseudomonads*: Experimental approaches. In: *Pseudomonas*. J. L. Ramos (ed). New York: Plenum Publisher, pp.
- Pamp, S. J. y T. Tolker-Nielsen, (2007) Multiple roles of biosurfactants in structural biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 189: 2531-2539.
- Park, S. M., C. D. Lu y A. T. Abdelal, (1997) Purification and characterization of an arginine regulatory protein, ArgR, from *Pseudomonas aeruginosa* and its interactions with the control regions for the *car*, *argF*, and *aru* operons. *J Bacteriol* 179: 5309-5317.
- Pelton, J. G., S. Kustu y D. E. Wemmer, (1999) Solution structure of the DNA-binding domain of NtrC with three alanine substitutions. *J Mol Biol* 292: 1095-1110.
- Perez-Martin, J. y V. De Lorenzo, (1995) Integration host factor suppresses promiscuous activation of the sigma 54-dependent promoter Pu of *Pseudomonas putida*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 7277-7281.
- Peterson, J. D., L. A. Umayam, T. Dickinson, E. K. Hickey y O. White, (2001) The Comprehensive Microbial Resource. *Nucleic Acids Res* 29: 123-125.
- Ramos, J. L., A. Stolz, W. Reineke y K. N. Timmis, (1986) Altered effector specificities in regulators of gene expression: TOL plasmid *xylS* mutants and their use to engineer expansion of the range of aromatics degraded by bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 8467-8471.
- Ramos, J. L., A. Wasserfallen, K. Rose y K. N. Timmis, (1987) Redesigning metabolic routes: manipulation of TOL plasmid pathway for catabolism of alkylbenzoates. *Science* 235: 593-596.
- Ramos, J. L., E. Duque, M. T. Gallegos, P. Godoy, M. I. Ramos-Gonzalez, A. Rojas, W. Teran y A. Segura, (2002) Mechanisms of solvent tolerance in gram-negative bacteria. *Annu Rev Microbiol* 56: 743-768.
- Ramseier, T. M., (1996) Cra and the control of carbon flux via metabolic pathways. *Res Microbiol* 147: 489-493.
- Rashid, M. H. y A. Kornberg, (2000) Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 4885-4890.
- Ratliff, M., W. Zhu, R. Deshmukh, A. Wilks y I. Stojiljkovic, (2001) Homologues of neisserial heme oxygenase in gram-negative bacteria: degradation of heme by the product of the *pigA* gene of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 183: 6394-6403.
- Reitzer, L. y B. L. Schneider, (2001) Metabolic context and possible physiological themes of sigma(54)-dependent genes in *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev* 65: 422-444, table of contents.
- Reitzer, L., (2003) Nitrogen assimilation and global regulation in *Escherichia coli*. *Annu Rev Microbiol* 57: 155-176.

- Rheinwald, J. G., A. M. Chakrabarty y I. C. Gunsalus, (1973) A transmissible plasmid controlling camphor oxidation in *Pseudomonas putida*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70: 885-889.
- Robleto, E. A., I. Lopez-Hernandez, M. W. Silby y S. B. Levy, (2003) Genetic analysis of the *AdnA* regulon in *Pseudomonas fluorescens*: nonessential role of flagella in adhesion to sand and biofilm formation. *J Bacteriol* 185: 453-460.
- Rojo, F., D. H. Pieper, K. H. Engesser, H. J. Knackmuss y K. N. Timmis, (1987) Assemblage of ortho cleavage route for simultaneous degradation of chloro- and methylaromatics. *Science* 238: 1395-1398.
- Ronson, C. W., P. M. Astwood y J. A. Downie, (1984) Molecular cloning and genetic organization of C4-dicarboxylate transport genes from *Rhizobium leguminosarum*. *J Bacteriol* 160: 903-909.
- Ruiz-Manzano, A., L. Yuste y F. Rojo, (2005) Levels and activity of the *Pseudomonas putida* global regulatory protein Crc vary according to growth conditions. *J Bacteriol* 187: 3678-3686.
- Saier, M. H., Jr., (1996) Cyclic AMP-independent catabolite repression in bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 138: 97-103.
- Simm, R., M. Morr, A. Kader, M. Nimtz y U. Romling, (2004) GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. *Mol Microbiol* 53: 1123-1134.
- Sonawane, A. M., B. Singh y K. H. Rohm, (2006) The AauR-AauS two-component system regulates uptake and metabolism of acidic amino acids in *Pseudomonas putida*. *Appl Environ Microbiol* 72: 6569-6577.
- Soncini, F. C. y E. A. Groisman, (1996) Two-component regulatory systems can interact to process multiple environmental signals. *J Bacteriol* 178: 6796-6801.
- Sonnleitner, E., L. Abdou y D. Haas, (2009) Small RNA as global regulator of carbon catabolite repression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 21866-21871.
- Spiers, A. J., J. Bohannon, S. M. Gehrig y P. B. Rainey, (2003) Biofilm formation at the air-liquid interface by the *Pseudomonas fluorescens* SBW25 wrinkly spreader requires an acetylated form of cellulose. *Mol Microbiol* 50: 15-27.
- Springer, W. R. y D. E. Koshland, Jr., (1977) Identification of a protein methyltransferase as the *cheR* gene product in the bacterial sensing system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 533-537.
- Stalon, V. y A. Mercenier, (1984) L-arginine utilization by *Pseudomonas* species. *J Gen Microbiol* 130: 69-76.
- Stalon, V., C. Vander Wauven, P. Momin y C. Legrain, (1987) Catabolism of arginine, citrulline and ornithine by *Pseudomonas* and related bacteria. *J Gen Microbiol* 133: 2487-2495.
- Stock, A. M., V. L. Robinson y P. N. Goudreau, (2000) Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem* 69: 183-215.
- Stock, J. B. y D. E. Koshland, Jr., (1978) A protein methylesterase involved in bacterial sensing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75: 3659-3663.
- Studholme, D. J. y R. Dixon, (2003) Domain architectures of sigma54-dependent transcriptional activators. *J Bacteriol* 185: 1757-1767.
- Teitzel, G. M., A. Geddie, S. K. De Long, M. J. Kirisits, M. Whiteley y M. R. Parsek, (2006) Survival and growth in the presence of elevated copper: transcriptional profiling of copper-stressed *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 188: 7242-7256.
- Timmis, K. N., (2002) *Pseudomonas putida*: a cosmopolitan opportunist par excellence. *Environ Microbiol* 4: 779-781.

- Tolker-Nielsen, T. y S. Molin, (2000) Spatial Organization of Microbial Biofilm Communities. *Microbial ecology* 40: 75-84.
- Tolker-Nielsen, T. y C. Sternberg, (2011) Growing and analyzing biofilms in flow chambers. *Current protocols in microbiology* Chapter 1: Unit 1B 2.
- Trent, M. S., A. A. Ribeiro, S. Lin, R. J. Cotter y C. R. Raetz, (2001) An inner membrane enzyme in *Salmonella* and *Escherichia coli* that transfers 4-amino-4-deoxy-L-arabinose to lipid A: induction on polymyxin-resistant mutants and role of a novel lipid-linked donor. *J Biol Chem* 276: 43122-43131.
- Tricot, C., V. Stalon y C. Legrain, (1991) Isolation and characterization of *Pseudomonas putida* mutants affected in arginine, ornithine and citrulline catabolism: function of the arginine oxidase and arginine succinyltransferase pathways. *J Gen Microbiol* 137: 2911-2918.
- Tropel, D. y J. R. van der Meer, (2004) Bacterial transcriptional regulators for degradation pathways of aromatic compounds. *Microbiol Mol Biol Rev* 68: 474-500.
- Tsuda, M., (1996) Catabolic transposons in *Pseudomonads*. In: *Molecular Biology of Pseudomonads*. T. Nakazawa, Furukawa, K., Haas, D., and Silver, S. (ed). Washington, DC: American Society for Microbiology Press, pp. 219-228.
- Valentini, M., N. Storelli y K. Lapouge, (2011) Identification of C(4)-dicarboxylate transport systems in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* 193: 4307-4316.
- Venturi, V., M. Otten, V. Korse, B. Brouwer, J. Leong y P. Weisbeek, (1995a) Alginate regulatory and biosynthetic gene homologs in *Pseudomonas putida* WCS358: correlation with the siderophore regulatory gene *pfrA*. *Gene* 155: 83-88.
- Venturi, V., C. Ottevanger, M. Bracke y P. Weisbeek, (1995b) Iron regulation of siderophore biosynthesis and transport in *Pseudomonas putida* WCS358: involvement of a transcriptional activator and of the Fur protein. *Mol Microbiol* 15: 1081-1093.
- Venturi, V., P. Weisbeek y M. Koster, (1995c) Gene regulation of siderophore-mediated iron acquisition in *Pseudomonas*: not only the Fur repressor. *Mol Microbiol* 17: 603-610.
- Vilchez, S., M. Manzanera y J. L. Ramos, (2000a) Control of expression of divergent *Pseudomonas putida* put promoters for proline catabolism. *Appl Environ Microbiol* 66: 5221-5225.
- Vilchez, S., L. Molina, C. Ramos y J. L. Ramos, (2000b) Proline catabolism by *Pseudomonas putida*: cloning, characterization, and expression of the put genes in the presence of root exudates. *J Bacteriol* 182: 91-99.
- West, A. H. y A. M. Stock, (2001) Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends Biochem Sci* 26: 369-376.
- Williams, P. A. y K. Murray, (1974) Metabolism of benzoate and the methylbenzoates by *Pseudomonas putida* (arvilla) mt-2: evidence for the existence of a TOL plasmid. *J Bacteriol* 120: 416-423.
- Wong, H. C., A. L. Fear, R. D. Calhoon, G. H. Eichinger, R. Mayer, D. Amikam, M. Benziman, D. H. Gelfand, J. H. Meade, A. W. Emerick y et al., (1990) Genetic organization of the cellulose synthase operon in *Acetobacter xylinum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 8130-8134.
- Wosten, M. M., J. A. Wagenaar y J. P. van Putten, (2004) The FlgS/FlgR two-component signal transduction system regulates the fla regulon in *Campylobacter jejuni*. *J Biol Chem* 279: 16214-16222.
- Yousef, F. y M. Espinosa-Urgel, (2007) In silico analysis of large microbial surface proteins. *Res Microbiol* 158: 545-550.

- Yuste, L., A. B. Hervas, I. Canosa, R. Tobes, J. I. Jimenez, J. Nogales, M. M. Perez-Perez, E. Santero, E. Diaz, J. L. Ramos, V. de Lorenzo y F. Rojo, (2006) Growth phase-dependent expression of the *Pseudomonas putida* KT2440 transcriptional machinery analysed with a genome-wide DNA microarray. *Environ Microbiol* 8: 165-177.
- Zhang, X., M. Chaney, S. R. Wigneshweraraj, J. Schumacher, P. Bordes, W. Cannon y M. Buck, (2002) Mechanochemical ATPases and transcriptional activation. *Mol Microbiol* 45: 895-903.
- Zhang, X. X. y P. B. Rainey, (2007) Genetic analysis of the histidine utilization (hut) genes in *Pseudomonas fluorescens* SBW25. *Genetics* 176: 2165-2176.
- Zhang, X. X. y P. B. Rainey, (2008) Dual involvement of CbrAB and NtrBC in the regulation of histidine utilization in *Pseudomonas fluorescens* SBW25. *Genetics* 178: 185-195.
- Zogaj, X., M. Nimtz, M. Rohde, W. Bokranz y U. Romling, (2001) The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Mol Microbiol* 39: 1452-1463.